



**Identificação de péptidos produzidos pela fermentação láctica de
subprodutos das indústrias de laticínios com capacidade inibidora das
gelatinases da matriz, MMP-2 e MMP-9.**

Sara Martins Sanches

Porto, 2015

Identificação de péptidos produzidos pela fermentação láctica de subprodutos das indústrias de laticínios com capacidade inibidora das gelatinases da matriz, MMP-9 e MMP-2.

Identification of peptides produced by lactic fermentation of dairy industry byproducts with the ability to inhibit the matrix metalloproteinases, MMP-9 and MMP-2.

Sara Martins Sanches

Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto

Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Professor Doutor Ricardo Manuel de Seixas Boavida Ferreira, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Ana Isabel Gusmão Lima, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Prof. Doutor José Alejandro Ribeiro dos Santos, Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Nutrição Clínica apresentada à Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

2015

ii

Agradecimentos

Ao Instituto Superior de Agronomia pela possibilidade de fazer a investigação necessária a este trabalho nas suas instalações.

Ao meu Orientador Professor Doutor Ricardo Boavida por me ter aceite no seu grupo, permitindo-me assim a realização deste trabalho, pelos conhecimentos, experiência e disponibilidade.

À minha co-orientadora, a Doutora Ana Lima, pelos ensinamentos e ajuda dada durante este percurso.

Ao meu co-orientador Prof. Doutor José Alejandro Santos, pelos conselhos e disponibilidade prestados.

À Prof^a Adélia e Isabel Santos por me terem permitido trabalhar com o soro de leite, incluindo-me assim no seu trabalho.

A todos os meus colegas de laboratório pela companhia, apoio e paciência em todos os momentos deste período, em especial ao Phill, Inês, Eduarda, Ana Cristina, Regina, Sofia, Filipe, Margarida, Catarina, Raimundo, António e Maria João. Ao Miguel por toda a ajuda e explicações dadas durante este trabalho. E em especial à Sabrina por todo o apoio, paciência, preocupação, ajuda interminável, motivação e amizade!

Um agradecimento especial à Jenni por toda a companhia, ajuda, motivação e paciência contínua, por me aturar em mais este percurso e, em especial, pela amizade! Agradeço ainda à Margarida pela amizade e apoio constante e, às duas pelas infindáveis viagens de comboio. Sem elas este mestrado não teria sido o mesmo.

À Carla pela sua amizade e por estar sempre presente.

Finalmente, quero agradecer à minha família por estarem sempre presente, por todo o apoio e motivação que me dão e por me terem sempre dado a oportunidade de prosseguir com os meus estudos. Aos meus Pais pela dedicação, paciência, empenho e apoio incondicional! Aos meus Irmãos por fazerem parte da minha vida, tornando-a melhor! À minha Avó, Madrinha e Avó pelo carinho, presença e apoio constante!

A todos os amigos que, de algum modo, me ajudaram e contribuíram para mais um período da minha vida.

Resumo

A principal causa de morte dos doentes com cancro colo-retal reside nas metástases e não no tumor primário. A invasão e a proliferação celular são fatores chave no desenvolvimento das metástases tumorais. Vários estudos têm demonstrado que as metaloproteinases de matriz (MMPs), mais especificamente as gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estão envolvidas no desenvolvimento tumoral uma vez que são responsáveis pela degradação da matriz extracelular. Deste modo, a sua inibição torna-se um mecanismo em estudo muito importante para a terapêutica e prevenção da doença oncológica e o estudo dos seus inibidores, essencial.

Vários estudos sugerem que a dieta pode ser preventiva para o cancro do cólon. O leite é constituído por um sistema proteico constituído por duas grandes famílias de proteínas: as caseínas (80%) e as proteínas do soro (20%). As proteínas do soro possuem diversas propriedades nutricionais e biológicas importantes, principalmente na prevenção de doenças, tendo apresentado efeitos anti-tumorais. Além disso, a fermentação do soro de leite com bactérias produtoras de ácido láctico leva à hidrólise das principais proteínas. Isto resulta na formação de péptidos bioativos que têm vindo a ser estudados devido às suas atividades benéficas para a saúde, como o seu efeito anti-tumoral. Assim, este trabalho pretendeu estudar o potencial anti-tumoral das proteínas e péptidos do soro de leite em células do cancro do cólon, o seu efeito na invasão e proliferação celular, se este efeito está relacionado com a inibição das MMPs e, ainda, determinar qual a fração do soro responsável pela atividade anti-tumoral.

Foi então avaliada a capacidade do soro de leite fermentado e não fermentado na inibição da atividade das gelatinases, MMP-2 e MMP-9, através de ensaios fluorimétricos e, ainda, através de zimografias reversas. Também foram realizados ensaios na linha celular de cancro do cólon HT-29 de modo a estudar o efeito do soro e da sua fermentação na invasão e proliferação celular.

Os resultados destes ensaios demonstraram que o soro de leite fermentado tem um potencial bioativo no cancro do cólon. Além de constatar que os péptidos bioativos libertados durante o processo fermentativo têm atividade inibitória das MMPs *in vitro*, também demonstrou ter efeito na inibição da invasão e proliferação celular. No entanto, este efeito não pareceu dever-se à inibição das MMPs presentes no meio extracelular.

Os resultados deste trabalho apontam para a necessidade de futuros estudos sobre o potencial anti-tumoral do soro do leite e do soro do leite fermentado.

Palavras-Chave

Soro de leite, fermentação, bactérias produtoras de ácido láctico, MMP-2, MMP-9, cancro do cólon, células HT-29, invasão celular, proliferação celular.

Abstract

The primary cause of death by colorectal cancer derives from metastization and not from the primary tumor itself. Cancer cell invasion and proliferation are the key factors in the development of cancer metastasis. Many studies have demonstrated that matrix metalloproteinases (MMPs), more specifically a group called gelatinases (MMP-2 and MMP-9), are involved in tumor development because of their ability to degrade extracellular matrices. Thus, the mechanism of their inhibition becomes an important topic to study for the prevention and therapeutics of cancer and the identification of potential inhibitors is essential.

Many studies suggest that diet can be a way of colon cancer prevention. Bovine milk comprises two major families of proteins: caseins (80%) and whey proteins (20%). Whey proteins possess an important variety of nutritional properties and bioactivities, especially those involved in the prevention of diseases, namely anti-cancer effects. Furthermore, whey fermentation by acid lactic bacteria hydrolyzes the major proteins in whey, which results in the formation of bioactive peptides that have been studied for their health-related bioactivities, such as their anti-tumor effect. Therefore, this work aimed to study the anti-tumor potential of whey proteins and peptides on colon cancer cells, their effect in cellular invasion and proliferation, if this effect was related to MMPs inhibition, and to ascertain the main whey fraction responsible for the anti-tumor activity.

The capacity of whey and fermented whey to inhibit gelatinase (MMP-2 and MMP-9) activities, was assessed by fluorimetric assays and reverse zymographys. Also, cellular assays with the colon cancer cell line HT-29 were performed, in

order to study the effect of whey and fermented whey samples in the mechanisms of cellular invasion and proliferation.

Our results showed that fermented whey has a bioactive potential on colon cancer. The performed assays showed that the bioactive peptides released during fermentation exhibit an inhibitory activity upon MMPs in vitro, particularly MMP-2, as well as on cellular invasion and proliferation. However, in the cells this effect didn't seem to be due to extracellular MMPs inhibition, but rather other mechanisms involved with cell proliferation.

As a whole, the results obtained show the need for future work on the anti-tumor potential of whey and fermented whey.

Keywords

Whey, lactic acid bacteria, MMP-2, MMP-9, colon cancer, HT-29 cells, invasion, proliferation.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Lista de Abreviaturas.....	xii
Lista de Figuras.....	xiv
Lista de Tabelas	xviii
1. Introdução	1
1.1. Metaloproteinases de matriz	2
1.2. O papel oncológico das gelatinases, MMP-2 e MMP-9.....	4
1.3. Leite, produtos lácteos e a saúde	7
1.4. O soro de leite.....	10
1.4.1. β -Lactoglobulina	12
1.4.2. α -Lactalbumina	13
1.4.3. Lactoferrina.....	14
1.4.4. Albumina sérica bovina.....	15
1.5. Processos fermentativos e saúde	15
1.6. Atividade anti-tumoral das proteínas e péptidos do soro de leite	17
2. Objetivos	20
3. Material e Métodos.....	21
3.1. Reagentes	21
3.2. Materiais biológicos.....	21
3.2.1. Soro de leite	21

3.2.2. Células HT-29.....	22
3.3. Ensaio fermentativo	22
3.3.1. Soro de leite (Queijo Saloio, Torres Vedra, Portugal)	22
3.4. Isolamento da fração polipeptídica de baixa massa molecular	22
3.5. Quantificação da lactose e do ácido láctico	23
3.6. Quantificação proteica.....	24
3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	25
3.8. Coloração dos polipéptidos no gel	26
3.8.1. Azul Coomassie R-250 (CBB-R-250)	26
3.8.2. Azul Coomassie G-250 coloidal.....	27
3.9. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> - HPLC	27
3.10. Ensaio de atividade gelatinolítica e zimografias.....	28
3.10.1. Quantificação da atividade gelatinolítica com MMP-2 e MMP-9 comerciais	28
3.10.2. Zimografia reversa	29
3.11. Ensaio celulares com células HT-29.....	30
3.11.1. Manutenção das células HT-29.....	30
3.11.2. Ensaio de proliferação celular	30
3.11.3. Ensaio de invasão celular.....	31
3.11.4. Zimografia	31
3.11.5. Quantificação da atividade gelatinolítica do meio extracelular	32

3.12.	Análise estatística	33
4.	Resultados e Discussão.....	34
4.1.	Caracterização do soro do leite	34
4.1.1.	Teor em ácido láctico, lactose e concentração proteica.....	34
4.1.2.	Análise do perfil proteico	36
4.2.	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> – HPLC.....	39
4.3.	Ensaio da atividade inibitória da MMP-2 e da MMP-9.....	44
4.3.1.	MMP-9	44
4.3.2.	MMP-2	47
4.4.	Zimografia reversa	49
4.4.1.	Zimografia reversa com MMP-9.....	50
4.4.2.	Zimografia reversa com MMP-2.....	52
4.5.	Ensaio celular	54
4.5.1.	Proliferação celular	54
4.5.2.	Invasão celular.....	57
4.5.3.	Zimografia gelatinolítica	62
4.5.4.	Atividade gelatinolítica com meio extracelular das células HT-29	64
4.6.	Avaliação do potencial bioativo do soro de leite no cancro colo-retal – Considerações finais	67
5.	Conclusão	73
	Referências Bibliográficas	75

Lista de Abreviaturas

ATV – Tripsina-EDTA

BAL – Bactérias produtoras de ácido láctico

BAMLET – *Bovine α -lactalbumin and oleic acid*

BSA – Albumina sérica bovina

CBB-R-250 – Azul brilhante de Coomassie R-250

CCR – Cancro colo-retal

Coomassie G – Azul de Coomassie coloidal

GSH – Glutathione

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

LF – Lactoferrina

ME - 2- Mercaptoetanol

MEC – Matriz extracelular

MMPIs – Inibidores sintéticos das MMPs

MMPs – Metaloproteinases de matriz

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MWCO – *Molecular Weight Cut-Off*

NF – Não fermentado

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PSA – Persulfato de amoníaco

RPMI – Meio *Roswell Park Memorial Institute*

SBF – Soro bovino fetal

SBR – Tampão de amostra redutor

SDS – Sulfato dodecilo de sódio

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

TCA – Ácido tricloroacético

TEMED – Tetrametiletilenodiamina

TFA – Ácido trifluoracético

TGF β – *Transforming Growth Factor β*

TIMP-2 – Inibidor tecidual das metaloproteinases 2

TIMPs – Inibidores específicos das metaloproteinases

UVB – Radiação ultravioleta B

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*

α -LA - α -Lactalbumina

β -LG - β -Lactoglobulina

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura modular do domínio modelador das MMPs;

Figura 2 – Ação das MMPs no desenvolvimento tumoral;

Figura 3 – Imagem representativa do perfil polipeptídico das frações proteicas da amostra total do soro de leite de mistura obtido por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida (17,5% m/v acrilamida), suplementado com 10% (v/v) glicerol. Soro de leite de mistura não fermentado (Dia 0) e fermentado durante 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dias;

Figura 4 – SDS-PAGE, (17,5% m/v acrilamida; suplementado com 10% v/v glicerol) ilustrativo da evolução do perfil polipeptídico das frações proteicas com massas moleculares compreendidas entre os 3 e os 10 kDa durante a fermentação do soro de leite;

Figura 5 - Cromatogramas obtidos por RP-HPLC, numa coluna C18, representativos da degradação das proteínas, e consequente formação de péptidos, ao longo dos seis dias de fermentação do soro de leite;

Figura 6 – Inibição da atividade gelatinolítica da MMP-9 na presença da amostra total do soro de leite durante a fermentação em relação ao controlo;

Figura 7 – Inibição da atividade gelatinolítica da MMP-9 na presença da fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite ao longo da fermentação em relação ao controlo;

Figura 8 – Inibição da atividade gelatinolítica da MMP-2 na presença da amostra total do soro de leite ao longo da fermentação em relação ao controlo;

Figura 9 – Inibição da atividade gelatinolítica da MMP-2 na presença da fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite ao longo da fermentação em relação ao controle;

Figura 10 - Imagem representativa de uma zimografia reversa obtida por SDS-PAGE (12,5% m/v acrilamida, suplementado com 10% m/v gelatina e $10\ \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de MMP-9). Em cada coluna do gel foi adicionada amostra total do soro de leite colhida ao longo dos seis dias de fermentação;

Figura 11 - Imagem representativa de uma zimografia reversa obtida por SDS-PAGE (12,5% m/v acrilamida, suplementado com 10% m/v gelatina e $1\ \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de MMP-9). Em cada coluna do gel foi adicionada a fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite colhida ao longo dos seis dias de fermentação;

Figura 12 - Imagem representativa de uma Zimografia reversa obtida por SDS-PAGE (12,5% m/v acrilamida, suplementado com 10% m/v gelatina e $1\ \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de MMP-2). Em cada coluna do gel foi adicionada amostra total do soro de leite colhida ao longo dos seis dias de fermentação;

Figura 13 - Imagem representativa de uma zimografia reversa obtida por SDS-PAGE (12,5% m/v acrilamida, suplementado com 10% m/v gelatina e $1\ \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de MMP-2). Em cada coluna do gel foi adicionada a fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite ao longo da fermentação;

Figura 14 – Percentagem de proliferação celular das células HT-29 em relação ao controle após adição da amostra total do soro de leite de mistura colhida durante a fermentação;

Figura 15 – Percentagem de proliferação celular das células HT-29 em relação ao controlo após adição da fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite colhida ao longo da fermentação;

Figura 16 – Taxa de invasão celular, em relação ao controlo, após o corte da monocamada de células HT-29 na presença da amostra total do soro de leite ao longo da fermentação, após 48 h;

Figura 17 – Taxa de invasão celular, em relação ao controlo, após o corte da monocamada de células HT-29 na presença da fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite ao longo da fermentação, após 48 h;

Figura 18 – Exemplos de migração celular, na presença da amostra total do soro de leite de mistura ao longo dos seis dias de fermentação, após o corte da monocamada de células HT-29, após 48 h;

Figura 19 - Exemplos de migração celular, na presença da fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite de mistura ao longo dos seis dias de fermentação, após o corte da monocamada de células HT-29, após 48 h;

Figura 20 – Imagem representativa da zimografia gelatinolítica obtida por SDS-PAGE (12,5% m/v acrilamida, suplementado com 10% m/v de gelatina). Meio extracelular das células HT-29 recolhido após ensaio da invasão celular com adição de inibidor: amostra total do soro de leite de mistura ao longo da fermentação;

Figura 21 - Imagem representativa da zimografia gelatinolítica obtida por SDS-PAGE (12,5% m/v acrilamida, suplementado com 10% m/v de gelatina). Meio extracelular das células HT-29 recolhido após ensaio da invasão celular com adição de inibidor: fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite de mistura ao longo da fermentação;

Figura 22 – Atividade gelatinolítica (% em relação ao controlo) do meio extracelular, das células HT-29, com amostra total do soro de leite de mistura ao longo da fermentação;

Figura 23 – Atividade gelatinolítica (% em relação ao controlo) do meio extracelular, das células HT-29, com fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite de mistura ao longo da fermentação.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Quantificação de lactose e do ácido láctico no soro de leite de mistura fermentado;

Tabela 2 - Concentração proteica da amostra total e da fração entre 3 e 10 kDa, de soro de leite de mistura fermentado.

1. Introdução

Em 2012 existiam, a nível mundial, 14,1 milhões de novos casos de cancro, 8,2 milhões de mortes por cancro e 32,6 milhões de pessoas que viviam com esta doença (diagnosticado há pelo menos 5 anos). O cancro colo-retal (CCR) é o terceiro tipo de cancro mais comum nos homens e o segundo nas mulheres a nível mundial, com 746 mil e 614 mil casos em 2012, respetivamente⁽¹⁾.

A incidência do CCR em países desenvolvidos é 18% mais elevada quando comparada com regiões menos desenvolvidas⁽²⁾. Esta variabilidade demonstra a importância que os fatores ambientais têm na etiologia deste cancro^(2, 3). Estudos epidemiológicos sugerem que a dieta é um fator determinante, sendo que, em relação ao cancro do cólon os principais fatores de risco são: o fenótipo, a dieta ocidental (pobre em fibra e rica em gordura saturada e carnes vermelhas), as técnicas utilizadas na preparação dos alimentos e o sedentarismo⁽⁴⁻⁶⁾. Estima-se que os fatores alimentares sejam responsáveis por cerca de 70 a 90% dos casos, sendo que a otimização da dieta poderá levar a uma diminuição da incidência desta doença maligna⁽⁷⁻¹⁰⁾.

Segundo o relatório elaborado pelo *World Cancer Research Fund* o consumo de carnes vermelhas e processadas, alimentos contendo ferro, queijo, alimentos ricos em gordura animal, alimentos açucarados e o consumo de bebidas alcoólicas está associado ao aumento do risco de CCR, tendo esta associação sido demonstrada com uma evidência convincente. Foi ainda demonstrado, no entanto, com evidência provável, que o ganho de peso na idade adulta, gordura corporal e gordura abdominal também se encontram associados

com o aumento do risco de CCR. Por outro lado, a atividade física demonstrou, com evidência convincente, uma associação com a diminuição do risco do CCR. Alimentos contendo fibra dietética, o leite e o cálcio também demonstraram possuir uma associação provável com a diminuição do risco de CCR⁽⁶⁾.

Estes dados mostram a necessidade de estudar novos agentes e estratégias que possam ser utilizados na prevenção e terapêutica desta doença tão prevalente.

1.1. Metaloproteinases de matriz

As metástases tumorais definem a agressividade do tumor e são a principal causa de morte no cancro^(11, 12). Nem todas as células tumorais primárias têm potencial para formar metástases. Para que isto aconteça, as células tumorais têm de possuir certas propriedades de modo a destacar-se da massa tumoral primária, migrar até os vasos linfáticos ou sanguíneos, atravessar a membrana vascular basal, penetrar no lúmen vascular, escapar à vigilância do sistema imunitário, aderir ao endotélio vascular dos órgãos (diferentes do local primário), realizar extravasão, sobreviver e crescer no ambiente invadido^(11, 13). Outro fator importante para que ocorra metastização tumoral é a angiogénese, uma vez que esta é necessária tanto para o crescimento da massa tumoral primária, como para o crescimento das metástases⁽¹⁴⁾. Além disso, os novos vasos sanguíneos que penetram no tumor são usados como via de entrada pelas células tumorais para a circulação⁽¹³⁾. Quando a formação das metástases ocorre, o prognóstico torna-se desfavorável uma vez que os novos tumores, além de inoperáveis, não respondem aos tratamentos convencionais (quimioterapia e radioterapia) aos quais o tumor primário é sensível⁽¹¹⁾. Deste modo, é de extrema importância o

estudo de novos agentes e estratégias que possam ser usados na prevenção e controlo da formação de metástases tumorais.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem uma família de endopeptidases responsáveis pela clivagem de diversos substratos proteicos através de um mecanismo que envolve a ativação de um local de ligação de uma molécula de água, através de um ião de zinco^(11, 15). Estas enzimas encontram-se envolvidas tanto em processos fisiológicos, como no desenvolvimento de diversas condições patológicas nomeadamente metástases tumorais, inflamação crónica, e consequente dano tecidular, e distúrbios neurológicos. O principal efeito fisiológico descrito sobre estas enzimas é a modelação e regulação do *turnover* da matriz extracelular (MEC), através da degradação direta dos seus componentes proteicos - colagénio, proteoglicanos e fibronectina^(11, 15).

As MMPs são secretadas em grande quantidade sob a forma de pró-proteína. Nesta forma, o domínio catalítico da enzima encontra-se protegido pelo pro-domínio, sendo que estes interagem através de um resíduo de cisteína e um ião de zinco, o chamado *cysteine switch*. A sua ativação pode ocorrer através de diversos mecanismos sendo, provavelmente o mais importante, a remoção proteolítica do pró-domínio por outras endopeptidases^(11, 15). As MMPs secretadas são classificadas de acordo com o seu substrato específico sendo, deste modo, divididas em collagenases, estromelisinases e gelatinases^(11, 15) (Figura 1).

Vários trabalhos que estudam os mecanismos subjacentes à invasão tumoral e ao desenvolvimento de metástases identificaram as MMPs como fatores chave nos processos que envolvem a disseminação tumoral⁽¹¹⁾.

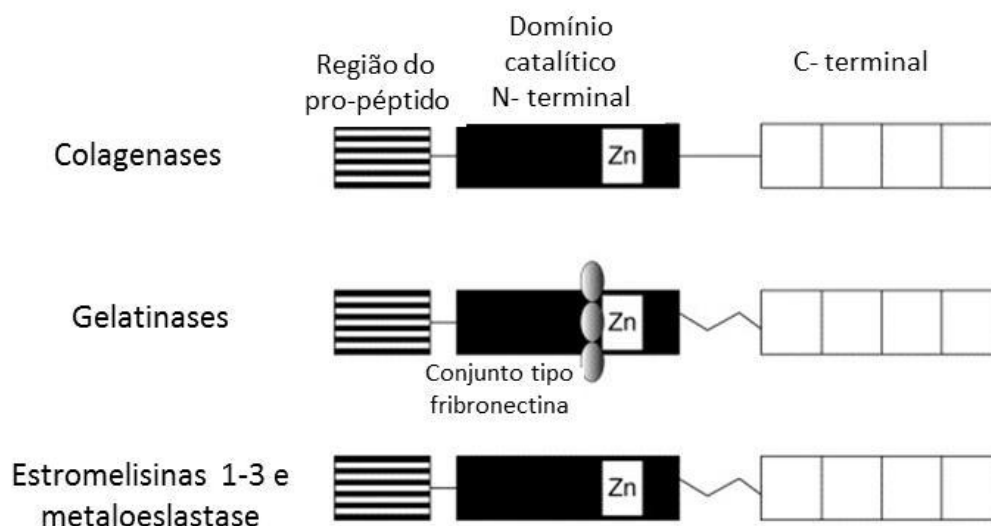


Figura 1 – Estrutura modular do domínio modelador das MMPs. Adaptado de Wee Yong V, 1998⁽¹⁶⁾.

1.2. O papel oncológico das gelatinases, MMP-2 e MMP-9

As gelatinases são as MMPs responsáveis pela degradação do colagénio desnaturado - a gelatina – e incluem a MMP-2 e a MMP-9⁽¹¹⁾.

A MMP-2 (gelatinase A) tem uma massa molecular de 72 kDa. É sintetizada sob a forma de pró-enzima e a sua ativação depende da ligação com o inibidor endógeno das MMPs, o inibidor tecidual das metaloproteinases 2 (TIMP-2). Este complexo é um substrato para a metaloproteinase de membrana MMP-14, que remove o pró-domínio da pro-MMP-2 através da clivagem proteolítica dando origem à enzima ativa com 64 kDa⁽¹⁷⁾. A MMP-2 é capaz de degradar a gelatina, os colagénios dos tipos I, IV e V, a elastina e a fibronectina⁽¹⁵⁾. A MMP-2 é amplamente expressa nas células do tecido conjuntivo⁽¹¹⁾.

Devido à sua capacidade de degradar o colagénio na membrana vascular basal, a MMP-2 encontra-se envolvida na neovascularização, tanto em condições fisiológicas como patológicas, como ocorre na metastização tumoral⁽¹⁸⁾. No

entanto, o estado de maturação da enzima parece influenciar a sua função na angiogénese. Enquanto a enzima na forma ativa induz apoptose nas células endoteliais e inibe a neovascularização, a sua forma de ativação intermédia (quando complexada com a MMP-14) melhora a sobrevivência celular e promove a angiogénese⁽¹⁵⁾.

A MMP-2 também atua na migração celular, uma vez que é responsável pela degradação direta da membrana basal⁽¹⁵⁾.

A MMP-9 (gelatinase B) tem uma massa molecular de 92 kDa na sua forma inativa, sendo que, ao ser ativada, se transforma numa enzima com 83 kDa. A sua ativação pode ocorrer através da remoção do pró-domínio por ação de proteases, incluindo outras MMPs. A expressão da MMP-9 ocorre em situações que necessitam da remodelação de tecidos, como no desenvolvimento, na cicatrização de feridas e na invasão tumoral^(11, 15).

A MMP-9 é responsável pela libertação da forma biologicamente ativa do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o qual tem um papel crucial na angiogénese. Este processo, juntamente com a capacidade da enzima em realizar a degradação proteolítica da membrana basal, indica que a MMP-9 tem um papel importante na formação de novos vasos sanguíneos^(15, 19).

As MMPs têm vindo a ser identificadas como fatores-chave na angiogénese, no crescimento e na metastização tumoral, tornando o seu estudo importante para a prevenção e tratamento da doença oncológica^(11, 13, 15, 20).

A angiogénese é um processo essencial para o crescimento tumoral uma vez que, sem vasos sanguíneos, o tumor não pode aumentar o seu tamanho nem metastizar. Deste modo, uma vez que o tumor depende da angiogénese, o bloqueio desta é uma estratégia para impedir o crescimento tumoral, podendo ser

usada na sua prevenção e terapêutica⁽¹⁴⁾. Por outro lado, a proliferação e a invasão celular também são fatores essenciais na metastização, necessitando, por isso, da atividade das MMPs para que ocorram (Figura 2)⁽²¹⁻²³⁾.

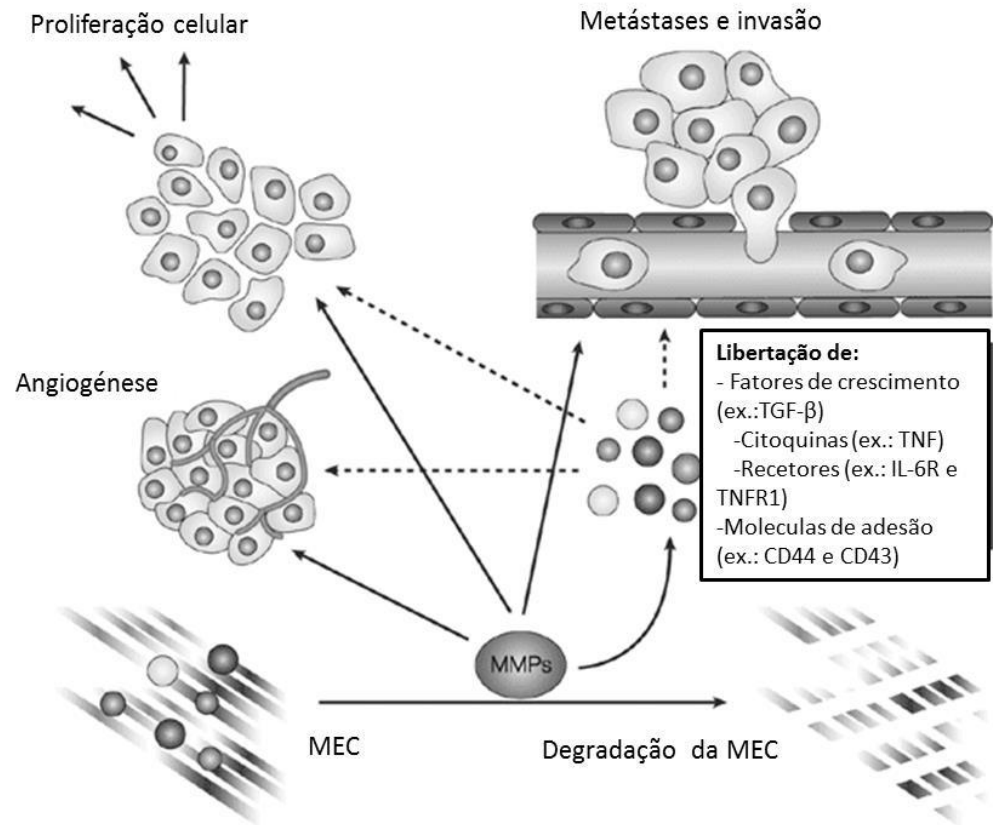


Figura 2 – Ação das MMPs no desenvolvimento tumoral. Adaptado de Rao JS, 2003⁽²⁴⁾

A maioria dos estudos que procuram desenvolver novos medicamentos anti-tumorais foca-se sobretudo no reconhecimento da célula tumoral, e subsequente indução de apoptose, ou direcionam-se na atividade das MMPs, desenvolvendo inibidores específicos destas enzimas, que atuam preferencialmente *in loco*^(25, 26).

A inibição das MMPs poderá ser um método interessante para a prevenção e tratamento da doença oncológica. Esta inibição ocorre, fisiologicamente, através

de pequenas proteínas denominadas de TIMPs (21 a 28 kDa), as quais bloqueiam a atividade proteolítica das MMPs ativas ao ligarem-se ao centro de ligação do zinco, fortemente conservado ao longo da evolução. Conhecem-se, atualmente, quatro TIMPs, produzidos por várias células como queratinócitos, fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais⁽¹¹⁾. Ensaios que usaram TIMPs e inibidores sintéticos das MMPs comprovaram a relação entre as MMPs e as metástases tumorais⁽¹¹⁾. Estas evidências levaram ao desenvolvimento e produção de inibidores sintéticos das MMPs^(25, 27). No entanto, os vários ensaios clínicos realizados com estes agentes provaram a sua ineficácia, além de terem apresentado efeitos secundários adversos graves, falhando assim o seu objetivo⁽²⁸⁾. Estes resultados foram associados, principalmente, a uma inibição não seletiva das MMPs por parte dos inibidores sintéticos das MMPs utilizados^(25, 27). Assim, a investigação tem-se virado cada vez mais para a procura de inibidores naturais das MMPs e o seu estudo revela-se de grande importância, uma vez que estes podem ser usados como terapêutica adjuvante da doença oncológica⁽²⁹⁾. Este aspeto assume ainda maior impacto a nível da procura de inibidores que façam parte de alimentos, uma vez que a dieta tem sido cada vez mais apontada como uma forma eficaz e importante na prevenção tumoral.

1.3. Leite, produtos lácteos e a saúde

Desde que se iniciou a prática da domesticação dos animais que o Homem começou a beber leite e, deste modo, a tirar benefício do elevado valor nutricional deste produto. O seu consumo tem vindo a ser relacionado com a saúde, uma vez que é uma boa fonte de proteína, gordura, vitaminas e minerais⁽³⁾. Estudos epidemiológicos têm vindo a demonstrar que o consumo de produtos lácteos é um

fator protetivo contra o desenvolvimento do CCR^(30, 31), além de também ter sido associado ao baixo risco de cancro na cavidade oral, estômago, reto e pulmão⁽³²⁾.

O leite e os produtos lácteos são uma boa fonte de proteína de elevada qualidade, o que faz com que sejam fornecedores de uma grande variedade de aminoácidos, em grande parte de aminoácidos essenciais. Além do seu elevado valor nutricional, tem sido reportada uma grande variedade de atividades biológicas associadas à componente proteica do leite⁽³³⁻³⁶⁾ e, ainda, ao seu elevado conteúdo em compostos com potencial bioativo como o cálcio, vitamina D e ácido linoleico⁽³⁾.

A fração proteica do leite é constituída principalmente por duas grandes famílias de proteínas: as caseínas e as proteínas do soro. As primeiras são insolúveis e representam cerca de 80% da constituição proteica, sendo as proteínas do soro do leite a menor componente, correspondente a 20%^(33, 34). Estas proteínas possuem propriedades nutricionais e biológicas importantes tanto a nível de promoção de saúde como na prevenção de doenças^(33, 34).

As proteínas do leite exercem, também, uma variedade de atividades fisiológicas, nomeadamente o aumento da função imune, atividade antibacteriana, antivírica e anti-levedura, e atuam ainda ao nível da maturação intestinal nos recém-nascidos^(36, 37). Ao longo dos anos também se tem vindo a estudar o efeito anti-tumoral do leite, sendo que as caseínas demonstraram ter propriedades anti-mutagénicas⁽³⁶⁾ e as proteínas do soro do leite, por sua vez, demonstraram possuir um potencial de supressão do desenvolvimento tumoral, estando este envolvido com o aumento dos níveis de glutathione (GSH)⁽³⁶⁾. Contudo ainda não se conhece claramente qual o mecanismo através do qual as proteínas do soro exercem os seus efeitos anti-tumorais.

Além do seu elevado conteúdo em micronutrientes, o leite também é rico em cálcio. Os efeitos deste mineral são fortemente dependentes dos níveis de vitamina D, sendo ambos responsáveis pela supressão da proliferação celular, além de também induzirem diferenciação e apoptose dos enterócitos⁽²⁾. Ralston e colegas, após estudarem a associação entre o consumo de diversos produtos lácteos e o desenvolvimento de cancro colo-retal, encontraram uma diminuição de 26% no risco de desenvolver este tipo de cancro em homens que consumiam uma média de 525 g/dia de leite não fermentado⁽³⁾.

Apesar dos inúmeros e importantes benefícios acima referidos, o consumo de leite e produtos lácteos tem vindo a ser tema de grande controvérsia nos últimos anos, tendo este alimento sido associado a diversos malefícios para a saúde. A intolerância à lactose, muito prevalente em certos grupos populacionais, é um dos fatores que leva cada vez mais pessoas a abandonarem o consumo de leite. Outro ponto negativo associado aos produtos lácteos é o seu elevado conteúdo em gordura saturada, que é um fator de risco para eventos cardiovasculares. Apesar de existirem produtos disponíveis com menor quantidade de gordura, esta acaba por ser consumida na forma de manteiga, gelados, entre outros⁽³⁸⁾.

O fator que tem sido alvo de maior crítica é a possível associação entre o consumo de leite e o aumento do risco do cancro do ovário e do cancro da próstata. Em relação ao primeiro, esta associação ocorre devido aos níveis elevados de galactose (monossacárido resultante da hidrólise da lactose) que danificam os ovários e, deste modo, aumentam o risco do cancro de ovário. Esta associação foi encontrada em mulheres que consumiam 3 ou mais porções de leite por dia^(39, 40). Em relação ao aumento do risco do cancro da próstata, a

associação parece ocorrer com o cálcio contido nos produtos lácteos e em quantidades correspondentes a mais de 2 porções de leite por dia ^(6, 41, 42). Além disso, alguns investigadores admitem a hipótese de que o processo industrial de produção de leite que se verifica nos dias de hoje altere a composição hormonal do leite de vaca de modo que este poderá ter um aumento no risco de cancros relacionados com hormonas⁽⁴³⁾.

As observações referidas anteriormente levaram a que a *Harvard School for Public Health* tivesse alterado as suas recomendações para o consumo de apenas uma a duas porções de produtos lácteos por dia, de modo a manter os valores de lactose e cálcio ingeridos dentro de uma gama segura⁽³⁸⁾.

Existe, hoje em dia, uma grande variedade de produtos lácteos e de alternativas que não contêm os fatores apontados como negativos ao leite. Deste modo, é possível respeitar os gostos, preferências e incompatibilidades (como alergias e intolerâncias) e continuar a usufruir dos benefícios deste grupo de alimentos, que podem ser usados como estratégias na terapia e/ou prevenção da doença oncológica.

1.4. O soro de leite

O soro de leite é a parte aquosa que é separada da coalhada durante a produção do queijo. Representa cerca de 85-90% do volume do leite e retém cerca de 50% dos nutrientes do leite, incluindo a proteína solúvel, lactose, minerais e vitaminas⁽⁴⁴⁾.

Desde que o Homem começou a fabricar queijo, por volta do ano 5000 a.C., que se criou a necessidade de dar uso ao produto secundário desta produção, o soro de leite. No entanto, este produto nunca foi tido em grande

consideração e, durante muito tempo, foi considerado como um produto com baixo valor (sendo apenas usado como aditivo na alimentação animal)^(33, 44).

Uma vez que o soro representa nove vezes o peso do queijo fabricado, todos os anos são produzidas grandes quantidades de soro de leite, o que demonstra a necessidade de procurar utilizações para este produto.

Já na Grécia antiga, Hipócrates louvava as propriedades benéficas que o soro de leite tinha para a saúde⁽³³⁾ e, durante séculos, os nossos antepassados usavam-no como medicamento, como componente de soluções para queimaduras, como bálsamo para a pele, “poção” para a vitalidade e para o cabelo e como afrodisíaco^(33, 44, 45). No entanto, este era raramente inserido na alimentação humana^(44, 45).

As proteínas do soro do leite, nomeadamente a α -lactalbumina (α -LA), a β -lactoglobulina (β -LG), a lactoferrina (LF), a albumina sérica bovina (BSA) e a lactoperoxidase possuem propriedades nutricionais e biológicas importantes, principalmente no que diz respeito à prevenção de doenças⁽⁴⁵⁾. As suas concentrações variam consoante o tipo de soro (ácido ou doce), a origem do leite, a altura do ano em que é produzido, o tipo de alimentação do animal, o estado da lactação e, ainda, a qualidade do processamento⁽⁴⁶⁾.

Além destas proteínas com atividade biológica que ocorrem naturalmente no soro, existe ainda uma variedade de péptidos bioativos que se encontram inseridos na sequência daquelas proteínas. A hidrólise controlada da proteína precursora leva à libertação destes péptidos bioativos, que têm um papel importante em diversas áreas⁽³³⁻³⁶⁾.

1.4.1. β -Lactoglobulina

A β -lactoglobulina (β -LG) é a proteína presente em maior quantidade no soro de leite. É uma proteína globular e solúvel composta por 162 resíduos de aminoácidos. Dependendo do pH do meio em que se encontra, esta molécula apresenta-se como um monómero, com uma massa molecular de 18 kDa, ou como um dímero com 36,7 kDa⁽³⁶⁾.

A β -LG tem demonstrado uma proteção contra o desenvolvimento tumoral em estudos realizados em animais. O mecanismo subjacente a esta atividade anti-tumoral tem sido associado ao seu elevado conteúdo em aminoácidos sulfurados, o que parece exercer um efeito protetor no DNA na sua forma metilada. Além deste efeito, a β -LG também parece influenciar os níveis teciduais de GSH, devido ao seu elevado conteúdo em cisteína e glutamincisteína⁽³⁶⁾.

Além da bioatividade exercida pela molécula nativa, a β -LG exibe mais funções fisiológicas devido aos péptidos bioativos cujas sequências estão contidas na sua estrutura primária. Na sequência da proteína precursora, estes encontram-se inativos. Porém, após a sua libertação por proteólise enzimática, estes péptidos demonstram possuir atividades importantes para a saúde humana. As suas atividades anti-hipertensiva, anti-trombótica, opióide, antimicrobiana e hipocolesterolémica já foram comprovadas por diversos estudos. No entanto, os péptidos derivados da degradação proteolítica da β -lactoglobulina ainda não foram suficientemente estudados, nomeadamente em relação ao seu possível efeito anti-tumoral⁽⁴⁵⁾.

Devido ao seu elevado valor nutricional, esta proteína tem vindo a ser usada como ingrediente de eleição na formulação de diversos alimentos e bebidas⁽⁴⁷⁾. Porém, esta proteína é considerada um dos principais alergénios

presentes no leite, sendo que esta alergenicidade pode ser reduzida por vários processos, principalmente pela sua hidrólise⁽⁴⁸⁾.

1.4.2. α -Lactalbumina

A α -lactalbumina (α -LA) é, quantitativamente, a segunda proteína mais importante no soro de leite. É uma proteína globular composta por 123 resíduos de aminoácidos e consiste numa única cadeia polipeptídica fisiologicamente importante devido à sua necessidade na síntese da lactose^(33, 36). Além de ser responsável por várias atividades biológicas, tem a capacidade de induzir apoptose nas células tumorais e imaturas possuindo, deste modo, uma atividade anticancerígena^(36, 45).

A sua atividade anti-tumoral mais estudada é a que exerce quando há formação do complexo entre a α -LA e o ácido oleico (BAMLET). Este complexo demonstra ter atividade para destruir as células tumorais através de um mecanismo que envolve a permeabilização da membrana lisossomal. O BAMLET acumula-se rapidamente no compartimento endolisossomal das células tumorais induzindo a libertação das catepsinas lisossomais no citosol, seguido da ativação da proteína Bax, uma proteína pro-apoptótica da família das proteínas reguladoras de apoptose Bcl-2⁽³⁶⁾.

A α -LA também demonstrou induzir apoptose através de outros mecanismos, nomeadamente pelo aumento da concentração do cálcio, o que leva à alteração da taxa de crescimento celular. Este mecanismo leva à apoptose das células tumorais e imaturas, poupando as células epiteliais maduras⁽³⁶⁾.

A α -LA também exerce um efeito anti-proliferativo em linhas celulares de adenocarcinoma do cólon (HT-29), uma vez que baixas concentrações promovem

o crescimento celular durante 3 a 4 dias, havendo uma diminuição drástica ao fim deste período, o que sugere uma apoptose retardada^(33, 36, 49).

1.4.3. Lactoferrina

A lactoferrina (LF) é uma glicoproteína que se encontra presente no leite, numa concentração inferior às restantes proteínas. É uma glicoproteína de ligação ao ferro, com uma massa molecular de 80 kDa. Têm-lhe sido atribuídos diversos papéis fisiológicos, nomeadamente a regulação da homeostasia do ferro, atividade antimicrobiana, atividade anti-inflamatória, imuno-modeladora, ativação da transcrição celular e proteção contra o cancro⁽⁴⁵⁾.

Com a degradação da LF, o principal péptido produzido é a lactoferricina, que é responsável pela maioria dos seus efeitos imunomodulatórios⁽⁴⁵⁾, sendo considerada como o domínio ativo responsável pela atividade antimicrobiana da lactoferrina bovina⁽³⁶⁾. É um péptido constituído por 25 resíduos de aminoácidos, sendo dois deles resíduos de cisteína.

A LF tem demonstrado possuir uma atividade citotóxica *in vitro* para diferentes tipos de linhas celulares, incluindo células de leucemia, fibrossarcoma, vários carcinomas e neuroblastomas. Esta atividade citotóxica tem uma seletividade de ação devido à natureza catiónica da lactoferricina, que permite a este péptido atingir apenas as células tumorais negativamente carregadas, poupando as células saudáveis devido à sua carga neutra. No entanto, esta seletividade é a responsável pela lactoferricina não exercer a sua atividade nas células tumorais da próstata PC3, bem como noutros tipos de células cancerígenas que, devido à sua fraca carga negativa, são refratárias ao tratamento com a LF⁽³⁶⁾.

1.4.4. Albumina sérica bovina

A albumina sérica bovina (BSA) é constituída por 582 resíduos de aminoácidos e, apesar de não ser sintetizada na glândula mamária, aparece no leite através de uma passagem passiva da corrente sanguínea.

Laursen e colegas (1990) demonstraram que a BSA inibe o crescimento da linha celular MCF-7 de células do cancro da mama, uma vez que esta parece inibir a proliferação celular através da modelação da atividade de fatores de crescimento autócrinos⁽⁵⁰⁾.

1.5. Processos fermentativos e saúde

As bactérias produtoras de ácido láctico (BAL) têm sido utilizadas na indústria alimentar como culturas primárias na manufatura de carnes fermentadas e produtos lácteos. O principal metabolito produzido durante estas reações de fermentação é o ácido láctico, sendo que, durante este processo, há um aumento da acidez do leite, tornando o crescimento de outros microrganismos, que não as bactérias lácticas, inviável. Além do ácido láctico, estas bactérias também produzem compostos bacteriostáticos.⁽⁵¹⁾

O leite fermentado é uma parte importante na nossa alimentação. Desde os tempos antigos que o Homem se apercebeu do processo fermentativo sem, contudo, o compreender. Inicialmente, o leite fermentava espontaneamente e a reutilização dos vasos onde era armazenado e das ferramentas utilizadas conferiam uma certa repetibilidade e estabilidade ao processo fermentativo. Isto levou à utilização de microrganismos específicos para a produção de alimentos mais ou menos refinados sendo que, cada país acabou por desenvolver os seus

próprios leites fermentados como o iogurte, soro de leite coalhado e bebidas lácteas fermentadas, entre outros⁽⁵¹⁾.

O uso destas bactérias na fermentação de produtos lácteos tem demonstrado grandes benefícios, tanto a nível da produção como para o consumidor. Além da sua importância na preservação do alimento, têm uma importância nutricional e terapêutica.

As BAL têm vindo a ser usadas, com muito sucesso, no tratamento da diarreia, alergias alimentares e na doença inflamatória intestinal. Também demonstraram possuir propriedades na prevenção do cancro colo-retal ao inibirem o seu desenvolvimento e progressão através de múltiplas vias⁽⁵²⁾.

Além do benefício inerente às próprias bactérias, vários estudos têm sugerido que os produtos lácteos fermentados exibem propriedades anti-hipertensivas, antibacterianas, anti-tumorais e anti-mutagénicas⁽⁵³⁻⁵⁶⁾. Matar e colegas (1997) concluíram que, após fermentação de leite com bactérias lácticas com atividade proteolítica, são produzidos compostos anti-mutagénicos, tendo sugerido a libertação de péptidos bioativos como principal mecanismo⁽⁵³⁾.

Ao estudarem os efeitos biológicos do leite fermentado com a espécie proteolítica *Lactobacillus helveticus*, que tem a capacidade de induzir a libertação de elevadas quantidades de péptidos durante o processo fermentativo do leite, Rachid e colegas (2006) observaram que este diminuía significativamente o crescimento de tumores mamários induzidos quimicamente em ratos⁽⁵⁴⁾.

Este resultado veio ao encontro do estudo realizado por Biffi e colegas (1997), que tinham demonstrado um efeito anti-proliferativo no leite fermentado por várias bactérias lácticas, numa linha celular humana de cancro da mama. Apesar de não terem conseguido determinar qual o componente responsável por

este efeito, concluíram que seria um composto solúvel produzido pelas bactérias lácticas durante o processo fermentativo⁽⁵⁷⁾.

Estes estudos revelaram a importância do processo de fermentação e do consumo de leites fermentados na prevenção da doença oncológica, sem no entanto explicarem o mecanismo subjacente.

1.6. Atividade anti-tumoral das proteínas e péptidos do soro de leite

Estudos conduzidos em populações humanas e experiências realizadas em animais têm sugerido que, quer o leite quer outros produtos lácteos, exibem um efeito protetor contra o desenvolvimento do cancro colo-retal⁽⁵⁸⁾.

Têm vindo a ser publicados, nas últimas décadas, vários estudos epidemiológicos que sugerem que os produtos lácteos exercem um efeito inibitório no crescimento de vários tipos de tumores⁽⁵⁹⁾. Um estudo realizado na Suécia demonstrou uma associação positiva entre o consumo de laticínios e uma baixa incidência do cancro do cólon, tendo sido considerada a proteína, o cálcio, a riboflavina e a gordura⁽⁶⁰⁾. Diversas experiências efetuadas em roedores atribuíram esta atividade anti-tumoral à fração proteica do leite, em especial, às proteínas do soro de leite⁽⁵⁹⁾.

McIntosh e colegas (1995) demonstraram que a incidência de tumores do cólon, num grupo de ratos alimentados com proteínas do soro, era 30% menor quando comparado com a incidência de um grupo alimentado com soja e 25% menor quando comparado com um grupo alimentado com carne vermelha. Apesar da diferença não possuir significado estatístico, concluíram que a proteína do soro conferia uma maior proteção contra o desenvolvimento de tumores intestinais, quimicamente induzidos, quando comparada com a proteína da soja e

da carne vermelha. No entanto, não possuíam dados suficientes para avaliar o impacto da dieta na massa tumoral ⁽⁵⁸⁾.

Por sua vez, Hakkak e colegas (2001), ao compararem dietas à base de proteína do soro de leite e de caseína, concluíram que o grupo de ratos alimentado com proteínas do soro apresentava níveis médios de incidência de tumores no cólon 40% inferiores, quando comparado com os animais alimentados à base de caseína. No entanto, neste estudo não encontraram diferenças significativas na massa tumoral e na multiplicidade (número de tumores por rato) entre os dois grupos ⁽⁶¹⁾. A superioridade do efeito anti-cancerígeno das proteínas do soro de leite sobre a caseína também já tinha sido estudada por Bounous e colegas ^(59, 62, 63).

Um mecanismo explicativo proposto para este efeito anti-tumoral das proteínas do soro resulta da sua capacidade em aumentar a concentração de glutathione nos tecidos, devido ao seu elevado conteúdo em cisteína e γ -glutamylcisteína, que são substratos precursores para a síntese da GSH. A GSH é um tripéptido antioxidante que tem um efeito protetor muito importante sobre os efeitos secundários do stresse oxidativo e que participa na desintoxicação celular de agentes carcinogêneos ^(36, 59, 61). No entanto, não foram observadas diferenças nos níveis hepáticos de GSH detetados entre o grupo de ratos alimentado com proteína de soro e o grupo alimentado com caseína ⁽⁶¹⁾.

Attaallah e colegas (2012) compararam o efeito protetor da proteína do soro com o do seu hidrolisado proteico (mistura de péptidos e aminoácidos livres, derivada de uma hidrólise enzimática), uma vez que este último também demonstrava possuir propriedades antioxidantes. Após alimentarem dois grupos, um com proteína de soro e outro com hidrolisado de proteína do soro, concluíram

que o segundo, após indução química de tumores, apresentava uma menor incidência de tumores no cólon em comparação com o grupo alimentado com proteínas do soro. Sendo que o grupo alimentado com o hidrolisado das proteínas de soro apresentou uma incidência de apenas 33%, em comparação com o grupo alimentado com proteínas de soro, em que aquela proporção subiu para 91,9% de tumores, concluíram com significado estatístico que o hidrolisado proteico provou ser mais eficaz na prevenção do desenvolvimento de tumores no cólon, quando comparado com as proteínas do soro⁽⁶⁴⁾. No entanto, e como, uma vez mais, não houve diferenças estatísticas nos níveis de GSH entre grupos, nenhum mecanismo foi sugerido para este efeito anti-tumoral.

Partindo dos estudos acima mencionados, parece evidente que a atividade anti-tumoral dos produtos lácteos se deve essencialmente à sua fração proteica, mais especificamente, às proteínas do soro de leite e aos péptidos libertados durante a sua hidrólise. No entanto, o mecanismo através do qual atuam não está ainda estudado e esclarecido. Por este motivo, assume relevância verificar se a inibição das MMPs poderá estar relacionada com esta atividade anti-tumoral das proteínas e péptidos do soro de leite.

2. Objetivos

Como referido na Introdução, os péptidos presentes no soro do leite exibem um efeito anti-tumoral. Contudo o mecanismo subjacente não se encontra ainda esclarecido. Uma vez que a fermentação do soro do leite, além de libertar péptidos contidos nas suas proteínas, também apresenta efeitos benéficos para a saúde (e.g. metabolização da lactose), o objetivo deste trabalho foi o de fermentar o soro de leite e estudar os seguintes parâmetros:

- Avaliar o potencial anti-tumoral do soro de leite, fermentado e não fermentado, e o seu efeito na proliferação e na invasão celular;
- Verificar se este efeito está relacionado com a inibição das metaloproteinases de matriz, MMP-2 e MMP-9;
- Determinar qual a fração peptídica do soro mais importante a nível da atividade anti-tumoral: as proteínas nativas ou os péptidos bioativos, obtidos pela degradação parcial das proteínas principais durante a fermentação.

Como objetivo final procurar-se-á aferir como é que a ingestão do soro, ou o uso das suas frações com maior atividade, poderá ser usada como terapêutica adjuvante no tratamento da doença oncológica.

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho apresentavam um grau de pureza pró-análise e eram provenientes da Sigma (St Louis, EUA), da Bio Rad (Richmond, EUA), da Merck S. A. (Darmstadt, Alemanha), da VWR Chemical (Radnor, EUA), da Millipore (Canadá), da RPE ACS (Milão, Itália), da Chem-Ida NV (Bélgica) e da PanReac AppliChem (Barcelona, Espanha). Todas as soluções foram preparadas com água desionizada, obtida num sistema Mili-Q plus, da “Milipore” (Bedford, EUA).

3.2. Materiais biológicos

3.2.1. Soro de leite

O material biológico utilizado para a realização deste trabalho foi soro de queijo (doravante denominado soro do leite), proveniente da fábrica de produção do Queijo Saloio (Torres Vedras, Portugal), sendo este obtido de uma mistura de leite de diferentes ruminantes (vaca, cabra e ovelha). O soro foi adquirido diretamente na fábrica, aquando da produção do queijo. Durante o processo de fabrico deste, foi utilizado um fermento industrial composto por um determinado consórcio de espécies de bactérias lácticas constituído por *Lactococcus lactis lactis*, *Lactococcus lactis cremoris*, *Lactococcus lactis lactis* biovar. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. Para a

realização deste trabalho foi utilizado o soro não fermentado (Dia 0) e soro fermentado ao longo de seis dias (Dia 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

3.2.2. Células HT-29

Foi utilizada, durante este estudo, uma linha celular humana de um adenocarcinoma do cólon, HT-29 (ECACC 85061109), obtida de um adenocarcinoma de uma mulher caucasiana de 44 anos.

3.3. Ensaio fermentativos

3.3.1. Soro de leite (Queijo Saloio, Torres Vedra, Portugal)

O soro de leite foi fornecido pela fábrica de produção do Queijo Saloio já com um consórcio específico de bactérias lácticas, um fermento industrial (Danisco, Dinamarca) adicionado durante a produção do queijo a partir de leite de mistura.

O ensaio fermentativo foi realizado num balão de Erlenmeyer de 2 L, utilizando o fermento industrial, durante 6 dias, a uma temperatura controlada de 37 °C, sem agitação. Ao longo da fermentação foram recolhidas alíquotas diárias de 150 mL, sendo imediatamente conservadas a -20 °C para posterior análise.

3.4. Isolamento da fração polipeptídica de baixa massa molecular

O soro do leite apresenta diversos componentes proteicos com diferentes massas moleculares. De forma a separar estes vários componentes, as amostras de soro recolhidas ao longo da fermentação passaram por dois processos de ultrafiltração. O primeiro processo realizou-se num ultrafiltrador “Vivaspin” (Pall Corporation, EUA) com um *Molecular Weight Cut-Off* (MWCO) de 10 kDa. De seguida, o permeado foi submetido a um novo processo de ultrafiltração,

utilizando um filtro MWCO de 3 kDa, no qual se conservou o retido, obtendo-se assim uma fração proteica concentrada, desprovida de ácido láctico e dessalinizada, supostamente compreendida entre os 3 e os 10 kDa.

As ultrafiltrações foram realizadas numa centrífuga Beckman Coulter Allegra™ 25R a uma força constante de 2800 *g* e a 4 °C para evitar degradação proteica. A fração acima dos 10 kDa e o concentrado contendo a fração peptídica de baixa massa molecular, após serem recolhidos, foram guardados a uma temperatura de -20 °C até serem utilizados.

3.5. Quantificação da lactose e do ácido láctico

De modo a determinar o teor de lactose e de ácido láctico no soro de leite ao longo da fermentação recorreu-se à técnica de HPLC, que permite uma separação dos compostos com base em várias técnicas cromatográficas. Assim, para cada um dos compostos em estudo foi elaborada uma reta padrão, com a qual é possível relacionar a concentração de cada substância com a área do pico respetivo. Os compostos utilizados para cada reta padrão foram: lactose (Sigma-Aldrich, EUA) e ácido láctico (Sigma-Aldrich, EUA).

As amostras, depois de diluídas de 1:2 (v/v) com uma solução de 5 mM de ácido sulfúrico, foram sujeitas a uma centrifugação de 9300 *g* (centrífuga Eppendorf, modelo 5451 D, Alemanha), durante 10 min, após a qual se procedeu à filtração do sobrenadante em filtros Millipore ($\phi = 0,22 \mu\text{m}$). Foram efetuadas três réplicas de cada amostra, sendo injetados 10 μL em cada corrida, recorrendo a um injetor automático 717plus Autosampler (Waters Corporation, EUA), numa coluna SUGAR SH1011 (Showa Denko America, Inc., EUA). Cada corrida teve a duração de 30 min, a uma temperatura de 50 °C, tendo sido utilizado como

eluente 5 mM de ácido sulfúrico, com um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ (Waters Corporation, 515 HPLC Pump, EUA). A detecção dos compostos foi realizada em série, por medição da absorvância (210 nm), através de um detetor 486 Tunable Absorbance Detector (Waters Corporation, EUA) e por medição do índice de refração, através de um detetor 2410 Refractive Index (Waters Corporation, EUA). Os resultados foram finalmente processados através do *software* Empower Pro (Waters Corporation, EUA).

3.6. Quantificação proteica

O doseamento da proteína foi realizado através de uma modificação do método de Lowry. Esta modificação baseia-se na precipitação da proteína com desoxicolato de sódio e ácido tricloroacético (TCA). Após a precipitação segue-se a quantificação da proteína utilizando o reagente de Folin, o qual permite uma quantificação proteica total através da mudança de cor da amostra na solução^(65, 66).

Como padrão foi preparada uma reta de calibração com uma solução de BSA (Sigma-Aldrich, EUA), contendo 0; 2,5; 5; 15; 25 e 30 µg de proteína. As amostras de soro foram diluídas com água bidestilada, até perfazer 250 µL, de modo a conter, no máximo, 30 µg de proteína. A cada amostra e padrões foi adicionado 50 µL de desoxicolato de sódio 1% (m/v) e 1 mL de TCA a 10% (m/v).

Após 10 min de repouso procedeu-se a uma centrifugação durante 5 min a 8000 g numa centrífuga Eppendorf, modelo 5451 D. Os sobrenadantes foram rejeitados e os precipitados proteicos foram suspensos em 1 mL de uma solução contendo 20 mg de bicarbonato de sódio, 4 mg de hidróxido de sódio, 1,6 mg de tartarato de sódio, 10 mg de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,4 mg de sulfato de

cobre e incubados durante 10 min. De seguida, foi adicionado 0,1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, diluído em água bidestilada numa proporção de 1:2 (v/v). As amostras foram homogeneizadas e incubadas num período compreendido entre 30 min e 3 h, em condições de escuridão. Para finalizar, a absorvância de cada amostra foi lida num espectrofotómetro (S 20 Spectrophotometer, Boeco, Alemanha) a um comprimento de onda de 750 nm.

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

De forma a analisar o perfil polipeptídico das amostras, foi utilizada a técnica de eletroforese desnaturante em gel vertical de poliacrilamida (SDS-PAGE) em sistema descontínuo⁽⁶⁷⁾, constituído por um gel concentrador e um gel separador.

Para separar as proteínas presentes na amostra foi então utilizado um gel de 17,5% (m/v) acrilamida com a seguinte composição de gel concentrador e gel separador⁽⁶⁸⁾:

- Gel concentrador: 5% (m/v) acrilamida, 0,13% (m/v) bisacrilamida (*N,N*-metileno-bis-acrilamida), 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% (m/v) SDS, 0,1% (m/v) persulfato de amónio (PSA) e 0,05% (v/v) tetrametiletilenodiamina (TEMED);

- Gel separador: 17,5% (m/v) acrilamida, 10% (v/v) glicerol, 0,1% (m/v) bisacrilamida, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,01% (m/v) SDS, 0,03% (m/v) PSA e 0,03% (v/v) TEMED.

As amostras foram tratadas com tampão de amostra redutor (SBR), composto por 80 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 M 2- mercaptoetanol (ME), 2% (m/v) SDS, 15% (v/v) glicerol e 0,006% (m/v) *m*-cresol purpúreo e, de seguida, aquecidas durante 2 min a 100 °C num termobloco (Bio TDB-100, Biosan,

Letónia). Posteriormente foram centrifugadas a 10000 *g* durante 5 min numa centrífuga Eppendorf, modelo 5415 D.

A eletroforese decorreu em sistema vertical (Mini-PROTEAN Tetra Cell, BioRad, EUA), usando o tampão de eletroforese, uma solução constituída por 25 mM Trizma base e 192 mM glicina a pH 8,8 e 0,1% (m/v) SDS, a uma corrente constante de 20 mA e uma tensão não inferior a 200 V, com uma fonte de alimentação modelo EPS 500/400 (GE Healthcare, EUA).

3.8. Coloração dos polipéptidos no gel

Para detetar a presença de polipéptidos nos géis de poliacrilamida (SDS-PAGE), foram utilizados dois métodos diferentes com diferentes sensibilidades: o azul de Coomassie R-250 (CBB R-250, Merck, Alemanha) e o azul de Coomassie G-250 coloidal.

3.8.1. Azul Coomassie R-250 (CBB-R-250)

Após efetuada a eletroforese em gel de poliacrilamida, cada gel foi incubado durante aproximadamente 15 min numa solução fixadora de TCA a 10% (m/v), sob agitação e à temperatura ambiente. De seguida, o gel foi lavado com água bidestilada para remoção do excesso de ácido e foi colocado a corar numa solução contendo 0,25% (m/v) de CBB-R-250, 25% (v/v) de 2-propanol e 10% (v/v) de ácido acético, no mínimo, durante 3 h. Para a descoloração, o gel foi transferido para uma solução de 25% (v/v) 2-propanol e 10% (v/v) ácido acético, sempre com agitação e à temperatura ambiente, até as bandas se tornarem nitidamente visíveis.

3.8.2. Azul Coomassie G-250 coloidal

A técnica de coloração azul de Coomassie coloidal envolve uma etapa inicial de fixação de 2 h em 50% (v/v) metanol e 2% (v/v) ácido fosfórico. Seguidamente, efetuam-se lavagens sucessivas de 30 min com água bidestilada, seguidas de um período de incubação de aproximadamente 1 h com uma solução contendo 34% (v/v) metanol, 17% (m/v) sulfato de amónio e 2% (v/v) ácido fosfórico. Após o período de incubação foi adicionada uma solução de 1,1% (m/v) de Coomassie G em 34% (v/v) de metanol. O período de coloração decorreu entre 48 h e 5 dias, sendo posteriormente efetuada uma lavagem com água bidestilada de forma a remover o excesso de corante.

3.9. *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC

Foi utilizado um aparelho HPLC (*Waters 2695 Separations Modulo*) equipado com um detetor (*Waters 2998 Photodiode Array Detector*) e duas colunas. Durante a cromatografia de fase reversa (do Inglês RP = *reverse phase*) os polipéptidos foram separados numa coluna C18 Zorbax 300SB 5 µm de dimensões 250 mm x 4.6 mm. Primeiro foi utilizado um solvente, solvente A, constituído por água contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA) e, de seguida, um segundo solvente, solvente B, constituído por acetonitrilo contendo 0,1% (v/v) de TFA. A deteção dos picos foi efetuada nos comprimentos de onda de 214 nm e 280 nm. A identificação das proteínas do soro do leite foi realizada de acordo com o tempo de retenção de padrões comerciais.

3.10. Ensaios de atividade gelatinolítica e zimografias

3.10.1. Quantificação da atividade gelatinolítica com MMP-2 e MMP-9 comerciais

Para a quantificação da atividade inibidora do soro do leite nas enzimas MMP-9 e MMP-2 foi utilizado um ensaio fluorimétrico com a gelatina *dye-quenched* (DQ) ⁽⁶⁹⁾, utilizando o *kit* EnzCheck© (Invitrogen).

Foi utilizada gelatina DQ (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA) dissolvida em água bidestilada, para obter uma concentração final de 1 mg.mL⁻¹. Posteriormente, todas as soluções e diluições foram realizadas com um tampão de ensaio (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ e 0,01% (v/v) Tween 20). A concentração da gelatina DQ utilizada foi de 2,5 µg.mL⁻¹.

Para o ensaio foram utilizadas microplacas pretas com 96 poços onde foi adicionado, em cada um, 40 µL da respetiva enzima (MMP-9 ou MMP-2, Sigma) a 0,1 mM. Para testar o efeito inibitório da amostra foi adicionado o volume correspondente a 50 µg de proteína do inibidor em cada poço e, de modo a obter um volume final de 200 µL, adicionou-se ainda tampão de ensaio. Posteriormente a placa foi colocada a incubar a 37 °C durante 1 h. De seguida, foram adicionados 40 µL de gelatina DQ e a placa foi novamente incubada nas mesmas condições. Após 1 h a fluorescência foi medida, num espectrofotómetro (Synergy HT, Bio-TEK). Este ensaio continha dois controlos, um positivo (sem inibidor) e um negativo (sem enzima). Para análise dos resultados, todos os valores foram corrigidos pela subtração dos respetivos controlos negativos.

O ensaio descrito acima baseia-se na reação de proteólise, realizada pelas gelatinases A e B, na gelatina DQ. Uma vez que este substrato tem uma

fluorescência intrínseca, que é ativada após a quebra da molécula, é possível medir a atividade enzimática da MMP-2 e da MMP-9, na presença e ausência de inibidores. O método permite, então, medir a atividade gelatinolítica e, ainda, avaliar a inibição direta de um composto nas gelatinases.

3.10.2. Zimografia reversa

A zimografia reversa foi usada para detetar proteínas com atividade inibitória sobre as MMPs presentes em diferentes amostras. A zimografia reversa foi realizada num gel de poliacrilamida (15% m/v acrilamida):

- Gel de separação: 15% (m/v) acrilamida, 0,1% (m/v) bisacrilamida, 0,37 M Tris-HCl pH 8,8, 10% (m/v) gelatina, 0,03% (m/v) PSA, 0,03% (v/v) TEMED e 10 μ mol de MMP-9;

- Gel de concentração: 5 % (m/v) acrilamida, 1 % (m/v) bisacrilamida, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,03 % (m/v) PSA e 0,24 % (v/v) TEMED.

Após a eletroforese, que decorreu nas mesmas condições descritas anteriormente, o gel foi lavado numa solução de Triton X-100 (2,5% v/v) em três lavagens consecutivas de 30 min e incubado durante a noite numa solução com tampão de desenvolvimento (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM CaCl_2 , 1 μ M ZnCl_2 e 0,01% (m/v) de azida de sódio).

Posteriormente, os polipéptidos do gel foram corados com Coomassie Blue G-250, seguindo o protocolo previamente descrito, sendo que, as zonas coradas a azul representavam as zonas em que houve inibição da degradação da gelatina, mediada pelas frações resistentes à proteólise ou inibidoras da MMPs.

3.11. Ensaios celulares com células HT-29

3.11.1. Manutenção das células HT-29

A linha celular HT-29 foi mantida em meio RPMI (Meio *Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF), 200 mM de glutamina, 2×10^4 UI.mL⁻¹ de penicilina e 20 mg.mL⁻¹ de estreptomicina, em condições de 37 °C e atmosfera humidificada com 5% (v/v) de CO₂. A viabilidade celular era rotineiramente verificada com observação diária num microscópio invertido.

Após 48 h e no caso de as células apresentarem uma confluência compreendida entre 85 e 90%, era realizada a tripsinização da monocamada celular. Retirou-se o meio RPMI e foi realizada uma lavagem com tampão fosfato salino (PBS), esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 20 min. Após se retirar o PBS, foi adicionada tripsina-EDTA (ATV: 8 g.L⁻¹ NaCl, 1 g.L⁻¹ KCl, 1,1 g.L⁻¹ glucose hidratada, 0,58 g.L⁻¹ NaHCO₃, 0,2 g.L⁻¹ EDTA hidratado e 2 g.L⁻¹ tripsina) e a mistura foi incubada durante 15 min. Esta solução permite recolher a monocamada de células uma vez que estas se desagregam do frasco. Posteriormente, as células foram distribuídas em frascos e incubadas novamente a 37 °C até se obter novamente uma confluência entre os 85 e 90%. No caso de esta confluência não existir ao fim de 48 h, apenas se trocou o meio RPMI.

3.11.2. Ensaio de proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada pelo método padrão com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)⁽⁷⁰⁾. As células HT-29 foram colocadas, com uma densidade de ca. 2×10^4 células por poço, em placas de 96 poços e incubadas com 100 µg.mL⁻¹ do potencial inibidor. Após 24 h de

30

tratamento, o meio extracelular foi cuidadosamente removido e as células foram lavadas com PBS. Posteriormente, foram adicionados 25 µL de uma solução de MTT dissolvido em meio de cultura com uma concentração final de 0,5 mM em cada poço. As placas foram novamente incubadas durante 4 h a 37 °C. O PBS foi removido. De seguida, foram adicionados 200 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) de forma a solubilizar os cristais de MTT. Finalmente, e após agitação das placas, foi determinada a densidade ótica a 570 nm (OD_{570}), num espectrofotómetro (Synergy HT, Bio-TEK).

3.11.3. Ensaio de invasão celular

As células HT-29 foram colocadas a crescer em placas com 24 poços (5×10^5 células/poço) até atingirem, no mínimo, um valor de confluência de 80%. Foi realizado um risco na monocamada de células com uma ponta de pipeta de 100 µL de modo a criar uma abertura, simulando uma ferida. Posteriormente, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS, de forma a retirar os detritos resultantes. Cada poço foi preenchido com 1 mL de meio previamente descrito, com ou sem a presença de amostra com o potencial inibidor com uma concentração proteica de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, tendo permanecido as células a crescer durante 48 h. Após este período de crescimento, as células foram fotografadas e a área coberta pelas células migradas foi contabilizada em 3 locais diferentes de cada triplicado da amostra. Estes valores foram expressos em percentagem em relação ao controlo (sem potencial inibidor).

3.11.4. Zimografia

A zimografia é uma técnica eletroforética que permite avaliar a atividade das gelatinases, MMP-2 e MMP-9, presentes no meio extracelular das células HT-

29 após ensaio com adição do inibidor. A zimografia foi realizada num gel de poliacrilamida (12,5% (m/v) acrilamida) copolimerizada com gelatina:

- Gel de separação: 12,5% (m/v) acrilamida, 1% (m/v) bisacrilamida, 750 mM Tris-HCl pH 8,8, 10% (m/v) gelatina, 0,028% (m/v) PSA e 0,14% (v/v) TEMED.
- Gel de concentração: 5% (m/v) acrilamida, 1% (m/v) bisacrilamida, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,03% (m/v) PSA e 0,24% (v/v) TEMED.

As amostras, após recolhidas, foram tratadas com tampão de amostra (62,6 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% (m/v) SDS, 10% (v/v) glicerol).

Após a eletroforese, o gel foi lavado numa solução de 2,5% (v/v) Triton X-100, com três lavagens consecutivas de 30 min e incubado durante a noite numa solução com tampão de desenvolvimento (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM CaCl_2 , 1 μM ZnCl_2 e 0,01% (m/v) de azida de sódio).

A coloração do gel ocorreu com 0,5% (m/v) Coomassie G-250 em 30% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido acético. Para a descoloração utilizou-se uma solução com 30% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido acético até se observarem bandas brancas no gel azul.

3.11.5. Quantificação da atividade gelatinolítica do meio extracelular

O meio extracelular das células HT-29 foi colhido, após a realização do ensaio de invasão celular, para se quantificar a atividade gelatinolítica após exposição a diferentes inibidores. Esta atividade é devida à presença das duas enzimas, a MMP-2 e a MMP-9.

O ensaio decorreu da forma descrita no ponto 3.10.1. No entanto, foram usadas concentrações diferentes, uma vez que foi adicionado a cada poço 100 μL

do meio retirado das células HT-29 (onde estão presentes as enzimas MMP-9 e MMP-2) e 100 μ L da gelatina DQ.

3.12. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada com o programa PASW Statistics 18[®]. Todos os resultados são expressos pelas médias de pelo menos três amostras \pm desvio padrão. Para comparar o efeito dos potenciais inibidores e a comparação entre eles foi realizada a ANOVA, sendo $p \leq 0,05$ aceite como significativo.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização do soro do leite

As proteínas alimentares podem possuir, inscritas na sua estrutura primária, sequências que durante a digestão no trato gastrointestinal, originam péptidos bioativos através de degradação enzimática, ou mesmo durante o processamento dos alimentos, por hidrólise enzimática ou fermentação.

Durante o processo fermentativo, as BAL hidrolisam as proteínas do soro em péptidos e aminoácidos que são posteriormente utilizados como fontes de azoto, necessário ao seu crescimento⁽⁷¹⁾. A fermentação do soro por estas bactérias conduz também à diminuição do conteúdo de lactose, com consequente formação de ácido láctico e de outros metabolitos, como compostos aromáticos, o que contribui para o sabor, textura e aumento da solubilidade dos hidratos de carbono no produto final^(72, 73).

Após os processos fermentativos, realizados neste trabalho, com as estirpes *Lactococcus lactis lactis*, *Lactococcus lactis cremoris*, *Lactococcus lactis lactis* biovar. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* o soro de leite de mistura foi caracterizado em relação a diferentes parâmetros físico-químicos, nomeadamente o teor proteico total e os teores de lactose e de ácido láctico.

4.1.1. Teor em ácido láctico, lactose e concentração proteica

Durante a fermentação do soro observou-se que, em termos de produção de ácido láctico, houve um aumento acentuado até às 72 h tendo-se,

posteriormente, mantido relativamente estável até ao final da fermentação, com uma concentração de, aproximadamente, 20 g.L⁻¹. Como seria de esperar, este aumento foi acompanhado pela diminuição do teor em lactose (Tabela 1).

Tabela 1 – Evolução dos teores de lactose e de ácido láctico ao longo da fermentação do soro de leite. Os valores são a média de pelo menos três réplicas biológicas \pm desvio padrão.

Dias de fermentação	Lactose (g.mL ⁻¹)	Ácido láctico (g.mL ⁻¹)
Dia 0	58,9	3,3 \pm 0,02
Dia 1	42,7	8,8 \pm 0,06
Dia 2	35,8	18,1 \pm 0,07
Dia 3	32,1	20,3 \pm 0,03
Dia 4	30,6	19,6 \pm 0,15
Dia 5	30,5	20,4 \pm 0,04
Dia 6	29,1	20,9 \pm 0,12

Em relação à quantificação proteica, a amostra total do soro de leite demonstrou algumas variações ao longo dos dias, como se pode observar na Tabela 2. No entanto, a variação da concentração proteica é mais notória na fração entre os 3 e 10 kDa, uma vez que se observa o seu aumento ao longo dos dias de fermentação, que poderá ser coincidente com a libertação de péptidos obtidos pela degradação proteica parcial realizada por protéases das BAL.

Estudos realizados sobre o sistema proteolítico de diversas estirpes de bactérias comprovaram que existe libertação de péptidos bioativos anti-hipertensivos após hidrólise das proteínas do leite. As espécies *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* e a *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* foram duas das estirpes estudadas^(71, 74).

Tabela 2 – Evolução da concentração proteica na amostra total e na fração entre 3 e 10 kDa, ao longo da fermentação do soro de leite. Os valores foram obtidos pelo método de Lowry modificado e são a média de pelo menos três réplicas biológicas \pm desvio padrão.

Dias de fermentação	Proteína total (mg.mL ⁻¹)	Fração peptídica entre 3 e 10 kDa (mg.mL ⁻¹)
Dia 0	8,76 \pm 0,69	0,86 \pm 0,11
Dia 1	9,21 \pm 1,02	1,46 \pm 0,17
Dia 2	5,72 \pm 0,33	1,72 \pm 0,20
Dia 3	6,99 \pm 0,71	1,84 \pm 0,16
Dia 4	5,84 \pm 0,88	1,58 \pm 0,06
Dia 5	8,35 \pm 0,35	2,04 \pm 0,15
Dia 6	5,60 \pm 0,54	1,37 \pm 0,06

4.1.2. Análise do perfil proteico

A hidrólise das proteínas do soro pelas BAL foi também analisada por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida, como representado nas Figuras 3 e 4.

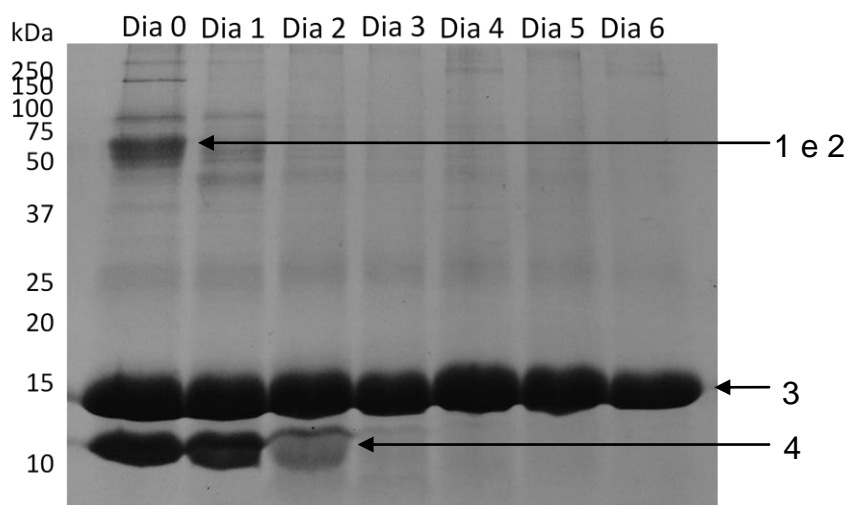


Figura 3 – Imagem representativa do perfil polipeptídico das frações proteicas da amostra total do soro de leite de mistura obtido por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida (17,5% m/v acrilamida), suplementado com 10% (v/v) glicerol. Soro de leite de mistura não fermentado (Dia 0) e fermentado durante 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dias. Os polipéptidos do gel foram corados com Coomassie G. Baseado na informação disponível na literatura e na massa molecular, as bandas numeradas são tentativamente identificadas como: 1 e 2 – BSA e LF; 3 – β -LG; 4 – α -LA.

Ao observar a Figura 3 é possível determinar que, em termos de perfil proteico, existe uma diminuição da intensidade das bandas ao longo dos dias de fermentação, especialmente os polipéptidos de maior massa molecular e o polipéptido de 14 kDa, o que se poderá traduzir num ataque proteolítico às várias frações proteicas do soro do leite pelas BAL. A banda correspondente à massa molecular de, aproximadamente, 14 kDa é a banda representativa da α -LA^(36, 75). Esta sofre uma diminuição na intensidade da banda, tornando-se aparentemente inexistente a partir do segundo dia de fermentação. É também neste dia que se pode observar a formação de fragmentos de menores dimensões (<10 kDa), que podem corresponder à formação de péptidos com propriedades bioativas. No entanto, a β -LG, banda correspondente à massa molecular de 18 kDa^(36, 76), já não apresenta uma diminuição da intensidade ao longo da fermentação, o que pode indicar que esta não terá sido hidrolisada pelas BAL⁽⁷⁷⁾.

É ainda possível observar, na amostra não fermentada (Dia 0), polipéptidos com massas moleculares compreendidas entre os 66 e os 80 kDa, correspondentes à BSA e à LF⁽³⁶⁾. Estas bandas também apresentam uma diminuição na sua intensidade, desaparecendo quase completamente durante o primeiro dia da fermentação. A partir deste dia observa-se a formação de fragmentos com menor massa molecular, o que poderá também corresponder à formação de péptidos.

Deste modo, é possível constatar que, no que diz respeito às principais proteínas do soro, o consórcio bacteriano utilizado para a fermentação demonstrou possuir uma grande capacidade de hidrólise da α -LA. Porém, no que diz respeito à β -LG, esta foi hidrolisada numa extensão muito menor, se é que houve hidrólise. Por outro lado, em relação às proteínas de elevada massa

molecular, como a BSA, a LF e ainda as imunoglobulinas, que são mais suscetíveis à atividade proteolítica das BAL, observou-se que sofreram hidrólise completa durante os primeiros dias de fermentação.

A Figura 4 mostra a evolução, durante a fermentação do soro de leite, do perfil peptídico da fração com massas moleculares compreendidas entre os 3 e os 10 kDa. Este gel permite visualizar claramente as bandas de fragmentos proteicos de menores dimensões, que poderão corresponder aos péptidos formados durante a fermentação ao longo dos dias.

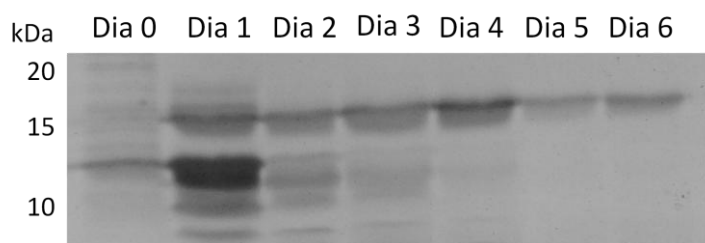


Figura 4 – SDS-PAGE, (17,5% m/v acrilamida; suplementado com 10% v/v glicerol) ilustrativo da evolução do perfil polipeptídico das frações proteicas com massas moleculares compreendidas entre os 3 e os 10 kDa durante a fermentação do soro de leite. Os polipéptidos do gel foram corados com Coomassie G.

Este perfil proteico mostra que, com o consórcio bacteriano utilizado para a fermentação do soro de leite de mistura, se obtém a formação e acumulação de péptidos derivados da degradação parcial das proteínas de maiores dimensões, incluindo provavelmente a α -LA.

Estes resultados são coincidentes com os resultados obtidos por Pescuma e colegas em termos de degradação proteolítica, que referiram que a proteína que obteve um maior grau de hidrólise foi a α -LA⁽⁷²⁾.

4.2. High Performance Liquid Chromatography – HPLC

A análise feita por HPLC à hidrólise das proteínas do soro do leite pelas BAL está representada na Figura 5(a-g). Durante a cromatografia de fase reversa (do Inglês RP = *reverse phase*), as proteínas e os péptidos são eluídos de acordo com a sua hidrofobicidade, sendo os hidrófilicos libertados primeiro e os mais hidrofóbicos por último.

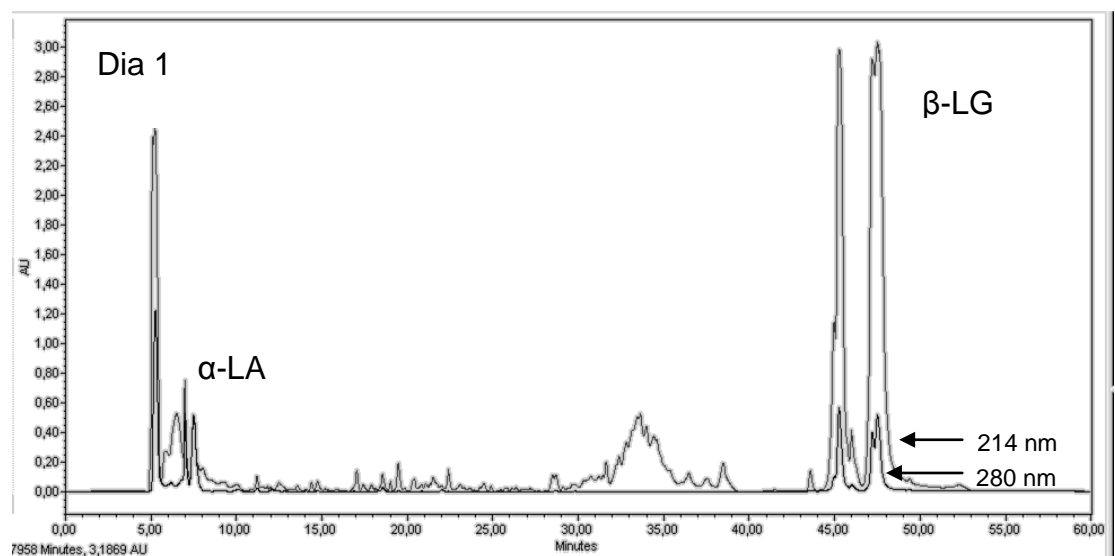
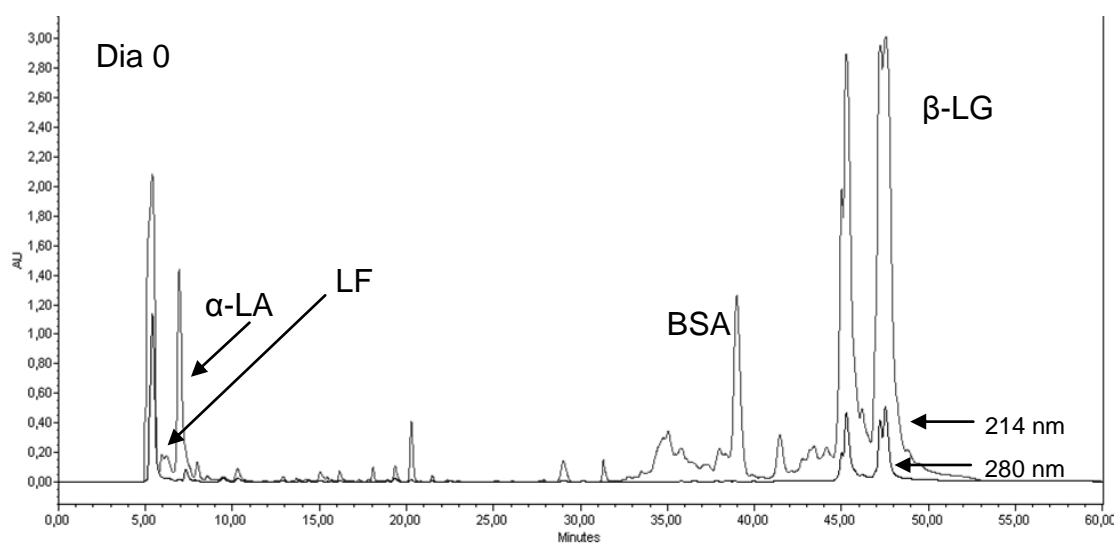


Figura 5 (Continuação)

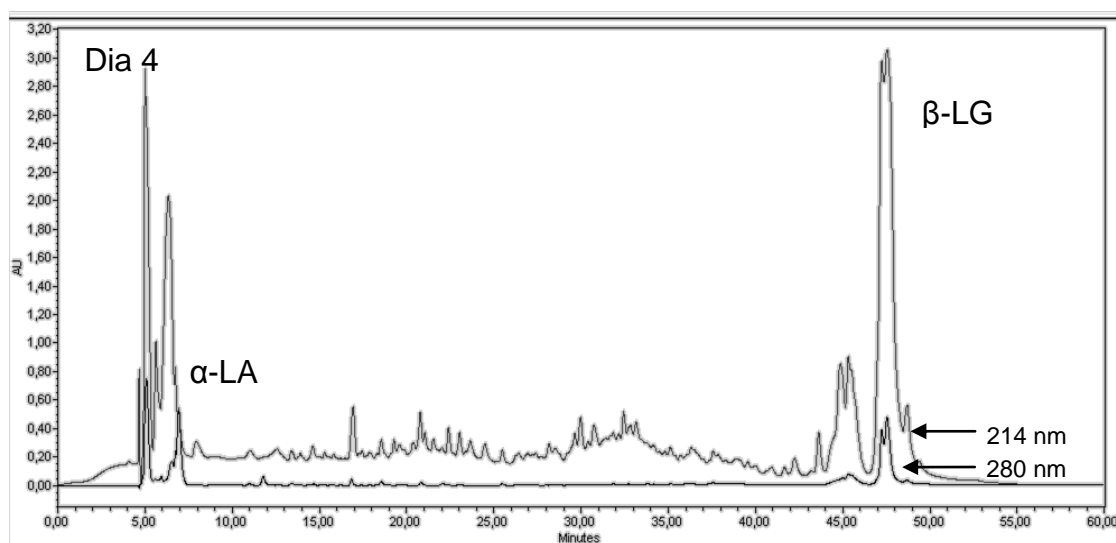
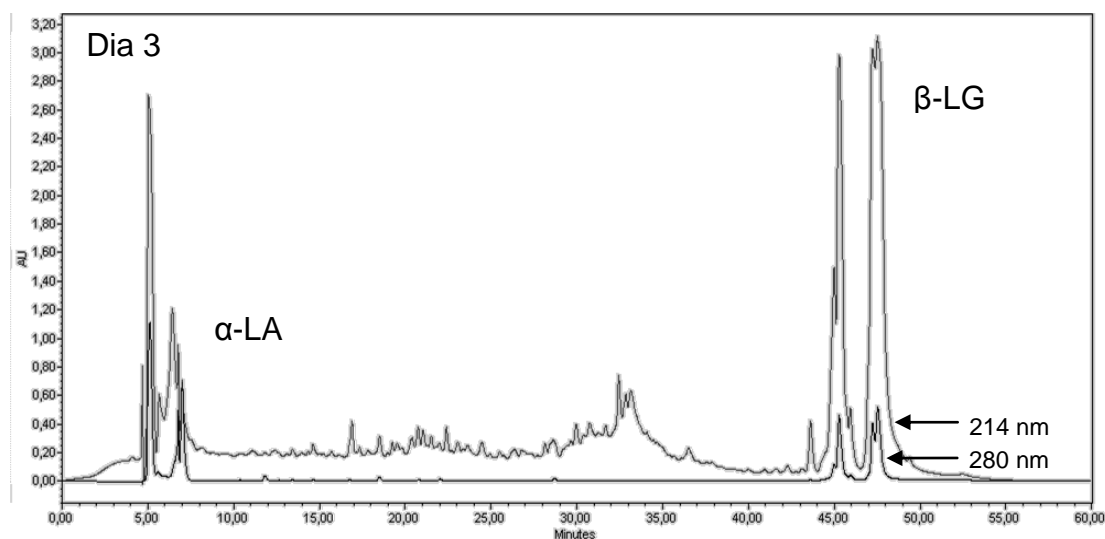
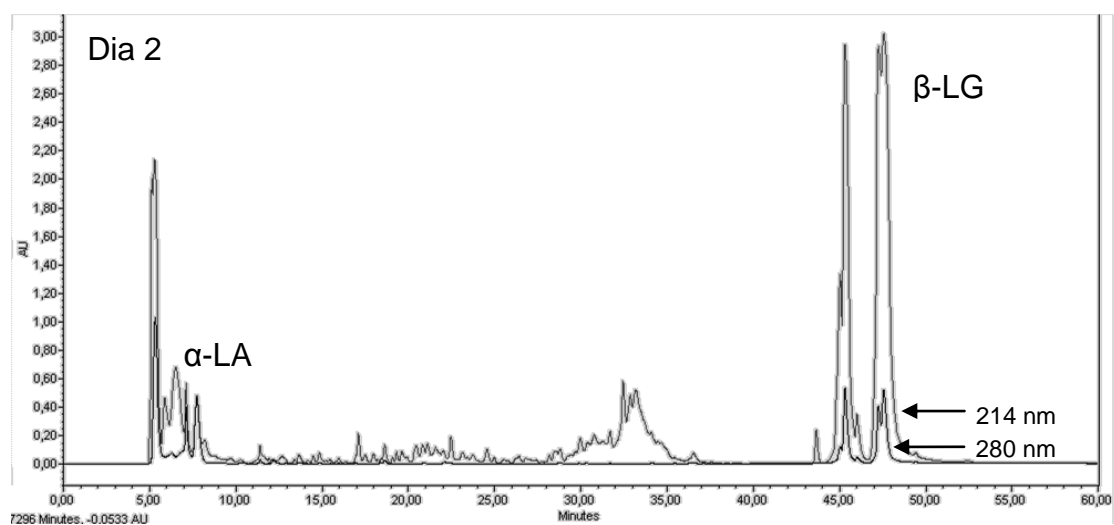


Figura 5 (Continuação)

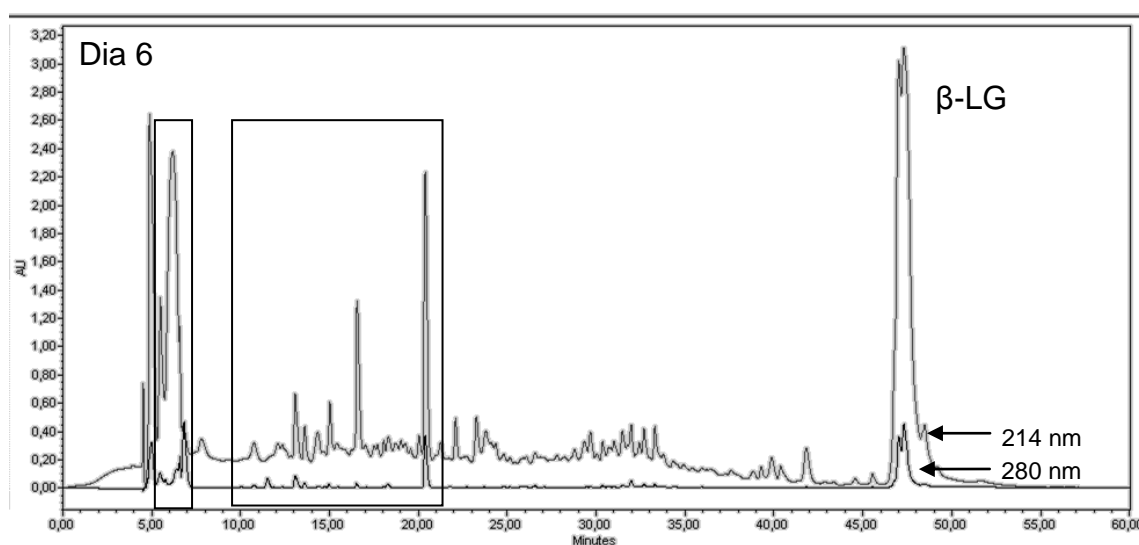
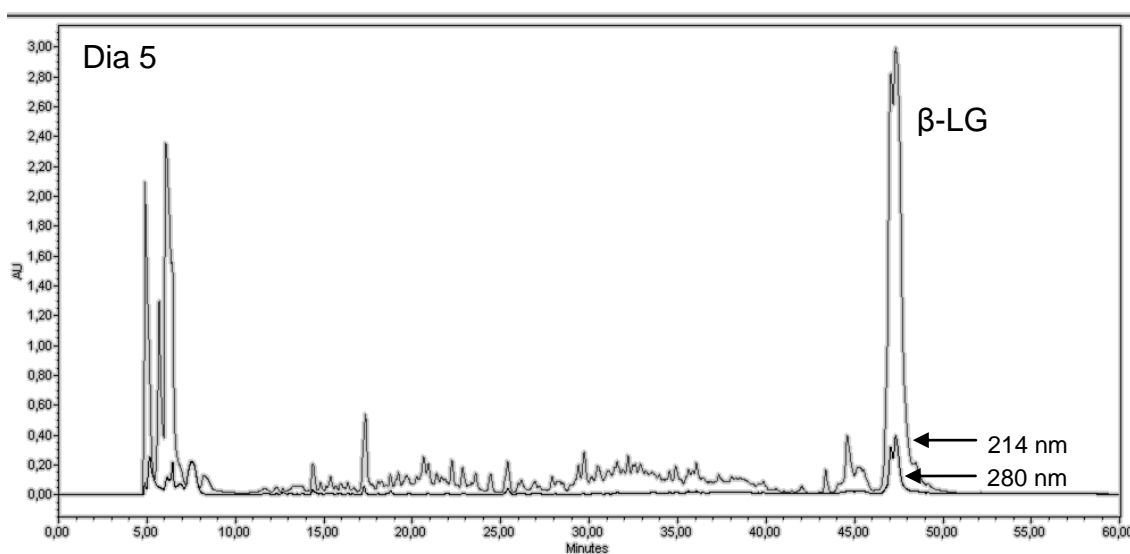


Figura 5 - Cromatogramas obtidos por RP-HPLC, numa coluna C18, representativos da degradação das proteínas, e consequente formação de péptidos, ao longo dos seis dias de fermentação do soro de leite. Os cromatogramas foram obtidos por medição da absorvância a 214 nm e a 280 nm.

A Figura 5-Dia 0 mostra o cromatograma correspondente ao dia 0 de fermentação do soro do leite. Comparando com os padrões comerciais das

principais proteínas do soro, foi possível identificar os picos no cromatograma correspondentes à α -LA, à BSA e à β -LG. Assim, podemos observar que a eluição da α -LA ocorreu entre os 6 e 8 min, da BSA entre os 38 e 40 min e da β -LG, a mais hidrofóbica, aos 47-49 min. Também foi possível identificar a LF com base no seu tempo de eluição por comparação com a eluição das restantes proteínas⁽⁷⁸⁾.

Passando ao cromatograma do primeiro dia de fermentação (Figura 5-Dia1), podemos constatar que o pico que representa a BSA desaparece completamente, o que é consistente com o perfil proteico apresentado no SDS-PAGE da amostra total do soro (representado na Figura 3). O mesmo acontece com o pico da LF.

Além da degradação da BSA e da LF, também é possível observar que o pico correspondente à α -LA sofreu uma diminuição em comparação com o pico apresentado no cromatograma do Dia 0, aparecendo um novo pico de seguida. Isto demonstra a hidrólise destas proteínas por parte das BAL.

Além desta diminuição, também é possível observar a formação de pequenos picos eluídos entre os 10 e os 30 min, que poderão corresponder à formação de pequenos péptidos decorrentes da degradação parcial da BSA, da LF e da α -LA.

A partir do segundo dia de fermentação é possível observar a formação de diversos picos que vão aumentando ao longo dos dias do processo fermentativo atingindo o seu máximo no último dia (Figura 5-Dia 2 a Dia 6). Por observação do cromatograma correspondente ao Dia 6, é possível constatar que existem 3 picos que se destacam: o pico que aparece entre os 5-8 min, vários picos mais

pequenos entre os 10 e os 20 min e, finalmente, a formação de um pico aos 20 min, que aparece pela primeira vez neste dia.

Uma vez que estes picos foram aumentando ao longo dos dias da fermentação do soro do leite, tendo atingido o seu máximo no último dia, podemos sugerir que poderão ser péptidos libertados pela hidrólise parcial das proteínas maiores. Além disso, a formação destes picos é coincidente com a diminuição do tamanho dos picos das principais proteínas.

A análise dos cromatogramas obtidos nos seis dias do processo fermentativo do soro de leite permite a identificação da formação dos novos péptidos. Estes péptidos podem ser formados pela degradação parcial das proteínas nativas do soro e/ou ser produzidos pelas próprias BAL. Uma vez que é no Dia 6 do processo fermentativo que se observam mais picos, ou seja, onde ocorre a formação de mais péptidos, este estudo demonstra a importância que o período do processo fermentativo tem na produção de péptidos com possíveis bioatividades.

Esta análise do soro do leite por HPLC permite associar as atividades biológicas encontradas nos diferentes dias de fermentação aos péptidos formados nesse período, uma vez que este ensaio apresenta uma boa sensibilidade para observar os polipéptidos formados.

Após a caracterização do soro do leite, passou-se então à realização dos ensaios para analisar a possível atividade anti-tumoral do mesmo.

4.3. Ensaios da atividade inibitória da MMP-2 e da MMP-9

O ensaio de atividade gelatinolítica baseia-se na reação de proteólise, realizada pelas gelatinases A e B (MMP-2 e -9, respetivamente) e utilizando como substrato a gelatina DQ. Uma vez que este substrato tem uma fluorescência intrínseca, que é ativada após a quebra proteolítica da molécula, é possível medir a atividade enzimática da MMP-2 e da MMP-9, na presença e ausência de possíveis inibidores. Este método permite, então, avaliar a atividade gelatinolítica e, deste modo, a inibição direta de um composto nas gelatinases.

4.3.1. MMP-9

Para avaliar o grau de inibição que o soro de leite tem na MMP-9, ao longo da fermentação, realizou-se um ensaio de avaliação da atividade gelatinolítica com a enzima MMP-9 de origem comercial, tanto na presença da amostra total, como da fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa, tendo sido adicionado de cada amostra o volume correspondente a 50 µg de proteína. Os resultados encontram-se ilustrados na Figura 6.

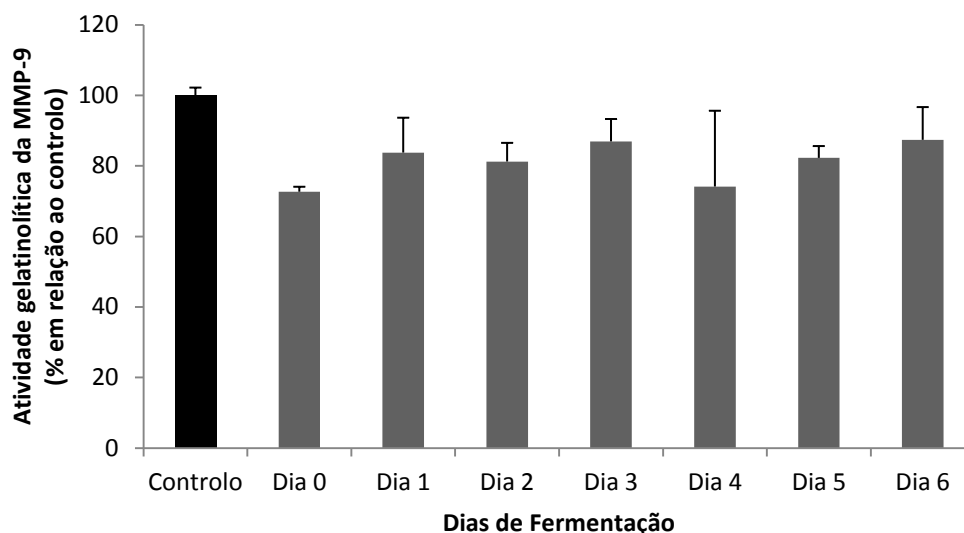


Figura 6 – Inibição da atividade gelatinolítica da MMP-9 na presença da amostra total do soro de leite durante a fermentação em relação ao controle. Os valores são apresentados em média \pm desvio padrão; * $p \leq 0,05$ vs. controle.

No ensaio realizado com amostra total, após a adição do possível inibidor, nota-se que houve um ligeiro grau de inibição na atividade da MMP-9 quando comparado com o controle. Analisando a Figura 6 é possível observar que os dias em que o grau de inibição foi maior foram os dias 0 e 4, com uma inibição de 27 e 26% respetivamente. Contudo, nenhuma das diminuições na atividade gelatinolítica apresentou significado estatístico ($p > 0,05$).

Uma experiência idêntica à descrita na Figura 6, mas utilizando como fonte potencial de inibidores a fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa originou os resultados apresentados na Figura 7.

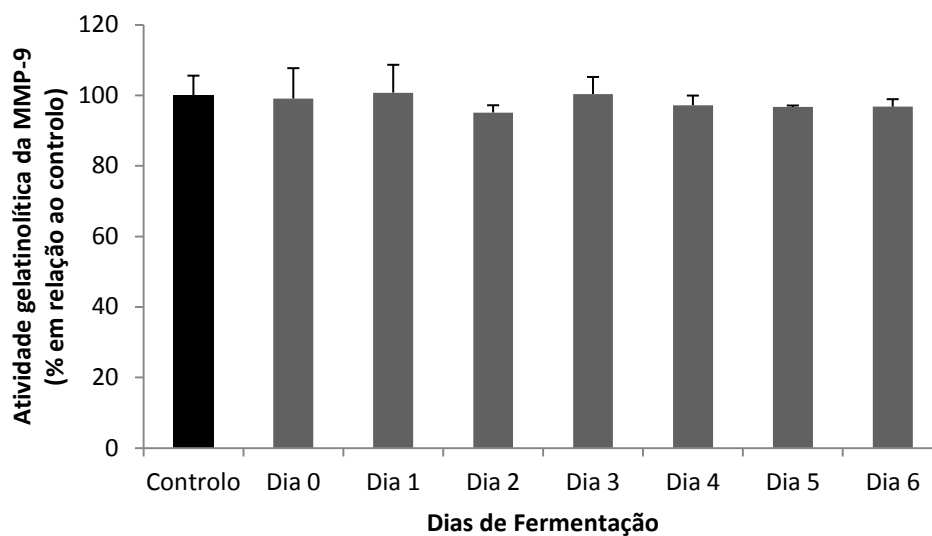


Figura 7 – Inibição da atividade gelatinolítica da MMP-9 na presença da fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite ao longo da fermentação em relação ao controlo. Os valores são apresentados em média \pm desvio padrão; * $p \leq 0,05$ vs. controlo.

Ao realizar o ensaio com a fração do soro de leite contendo as moléculas com uma massa molecular compreendida entre 3 e 10 kDa, não se observou nenhum grau de inibição significativo após adição do soro de leite, não havendo diferença em nenhum dos dias de fermentação em comparação com o controlo (Figura 7).

4.3.2. MMP-2

O efeito do soro de leite ao longo da fermentação na atividade da MMP-2 também foi determinado através do ensaio da atividade gelatinolítica com a enzima de origem comercial. Tanto a amostra total como a fração molecular com massas compreendidas entre 3 e 10 kDa foram estudadas, sendo adicionado o volume correspondente a 50 µg de proteína. Os resultados são apresentados nas Figuras 8 e 9, respetivamente.

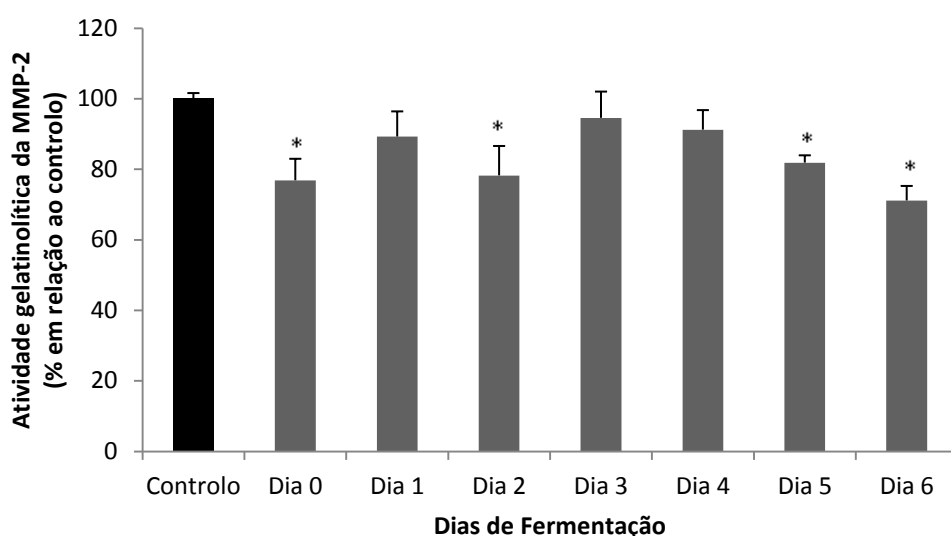


Figura 8 – Inibição da atividade gelatinolítica da MMP-2 na presença da amostra total do soro de leite ao longo da fermentação em relação ao controlo. Os valores são apresentados em média \pm desvio padrão; * $p \leq 0,05$ vs. controlo.

Ao realizar o ensaio com a amostra total do soro e observando a Figura 8, verifica-se que houve um grau de inibição da atividade da enzima MMP-2 em todos os dias da fermentação, quando comparado com o controlo. No entanto, os dias que se destacaram com um maior grau de inibição foram os dias 0, 2, 5 e 6, tendo apresentado significado estatístico ($p \leq 0,05$), com valores de inibição de 23, 22, 18 e 29% respetivamente.

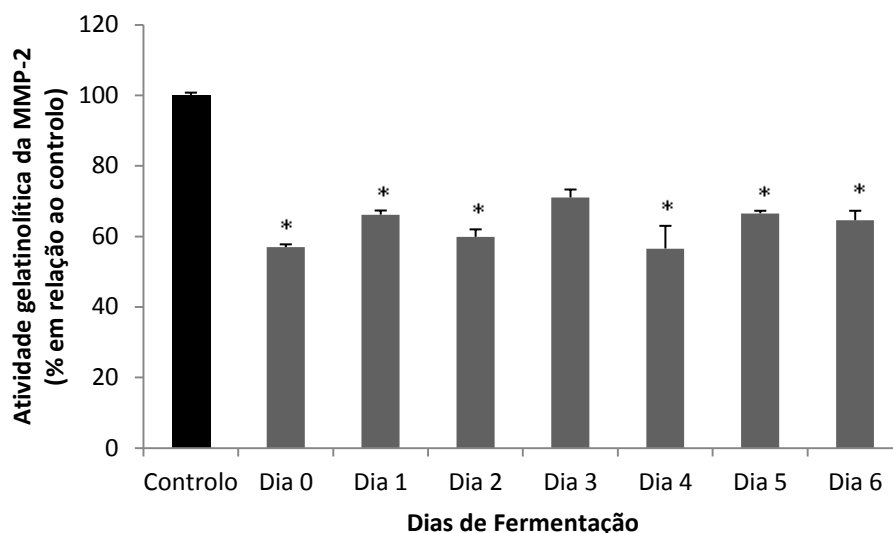


Figura 9 – Inibição da atividade gelatinolítica da MMP-2 na presença da fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite ao longo da fermentação em relação ao controlo. Os valores são apresentados em média \pm desvio padrão; * $p \leq 0,05$ vs. controlo.

Relativamente ao ensaio realizado com a fração molecular com massas compreendidas entre 3 e 10 kDa, é observável através da Figura 9, que houve um grau significativo de inibição da atividade da MMP-2, quando comparado com o controlo. Esta inibição ocorreu em todos os dias da fermentação, com significado estatístico ($p \leq 0,05$), exceto no dia 3. Assim, houve uma inibição da atividade da MMP-2 de cerca de 43% no Dia 0, 34% no Dia 1, 40% no Dia 2, 44% no Dia 4, 34% no Dia 5 e 35% no Dia 6. Comparando os resultados entre as duas frações, é possível constatar que a inibição desta enzima pela fração de baixa massa molecular do soro é maior do que a inibição que ocorre com a amostra proteica total.

Analisando os resultados da inibição da atividade de ambas as gelatinases com o soro de leite ao longo da fermentação, avaliado pelo ensaio da atividade gelatinolítica, podemos concluir que parece existir uma maior inibição da MMP-2

em comparação com a inibição da MMP-9. Tendo em consideração que a atividade gelatinolítica representa a degradação da gelatina pela enzima, estes resultados parecem indicar que o soro de leite, colhido ao longo da fermentação, não apresenta um efeito inibitório significativo da atividade da MMP-9. No entanto, quando as mesmas amostras são adicionadas à enzima MMP-2, parecem inibir a sua atividade. Além disso, é ainda possível constatar que a fração de baixa massa molecular do soro parece ter maior efeito na inibição da MMP-2 quando comparada com a amostra total, o que poderá sugerir a presença de péptidos bioativos formados durante a fermentação.

Estes resultados são coincidentes com os resultados obtidos por Antiopi Varelias e colegas. Estes estudaram o efeito de um extrato de soro bovino enriquecido com fatores de crescimento na modulação da expressão e atividade das enzimas MMP-9 e MMP-2 presentes em úlceras crônicas, bem como no inibidor tecidual da MMP-2 (TIMP-2). Após uma aplicação tópica do extrato proteico, enriquecido com fatores de crescimento, em úlceras durante quatro semanas, observou-se uma diminuição na MMP-2 ativa. O mesmo não se verificou na MMP-9 nem no TIMP-2⁽⁷⁹⁾. Estes resultados sugerem, portanto, que o soro do leite, particularmente a fração de baixa massa molecular, tem capacidade de inibição da MMP-2 e não da MMP-9.

4.4. Zimografia reversa

A zimografia reversa permite determinar se alguma fração da amostra em estudo é inibidora da ou resistente à ação da enzima presente no meio. Deste modo, realizaram-se zimografias reversas para cada gelatinase, para a MMP-2 e para a MMP-9, com a amostra total (Figura 10) e com a fração contendo as

moléculas com massas compreendidas entre 3 e 10 kDa (Figura 11) do soro do leite, colhido ao longo dos vários dias de fermentação.

4.4.1. Zimografia reversa com MMP-9

Após a realização da zimografia reversa com a enzima de origem comercial MMP-9, podemos observar através da Figura 10 que existem 2 frações na amostra total do soro de leite que são resistentes à ação ou inibidoras da atividade da MMP-9. Estas têm uma massa molecular entre 50 e 75 kDa e ocorrem no soro não fermentado (Dia 0) e no soro com 1 dia de fermentação (Dia 1).

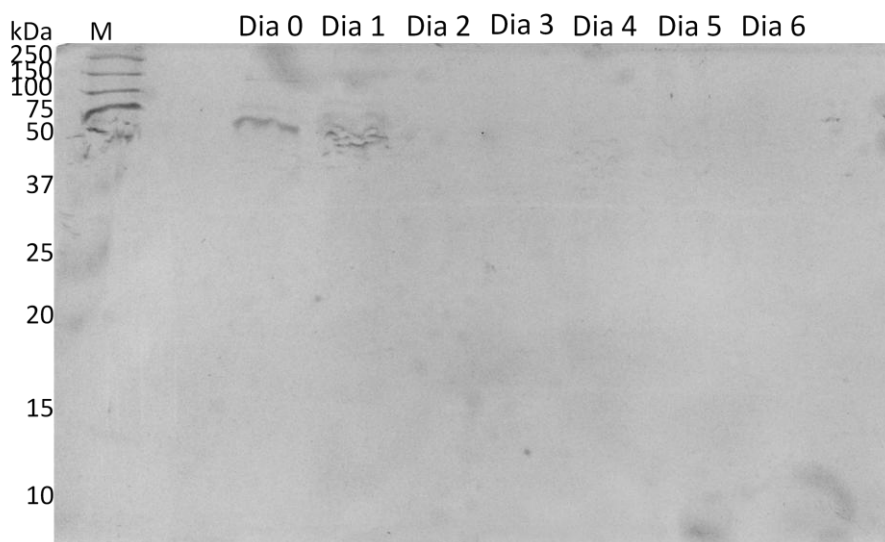


Figura 10 - Imagem representativa de uma zimografia reversa obtida por SDS-PAGE (12,5% m/v acrilamida, suplementado com 10% m/v gelatina e $10 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de MMP-9). Em cada coluna do gel foi adicionada amostra total do soro de leite colhida ao longo dos seis dias de fermentação. Coluna M: marcadores de massa molecular (kDa). Os polipéptidos do gel foram corados com Coomassie G.

No entanto, observando este ensaio zimográfico, não se observou nenhuma fração de baixa massa molecular que se apresentasse como resistente à ação da ou inibidora da atividade desta enzima. Deste modo, realizou-se uma

nova zimografia reversa com a fração do soro também colhida ao longo da fermentação, mas contendo apenas as moléculas de baixa massa molecular (3 a 10 kDa), uma vez que esta fração se encontra mais concentrada. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 11.

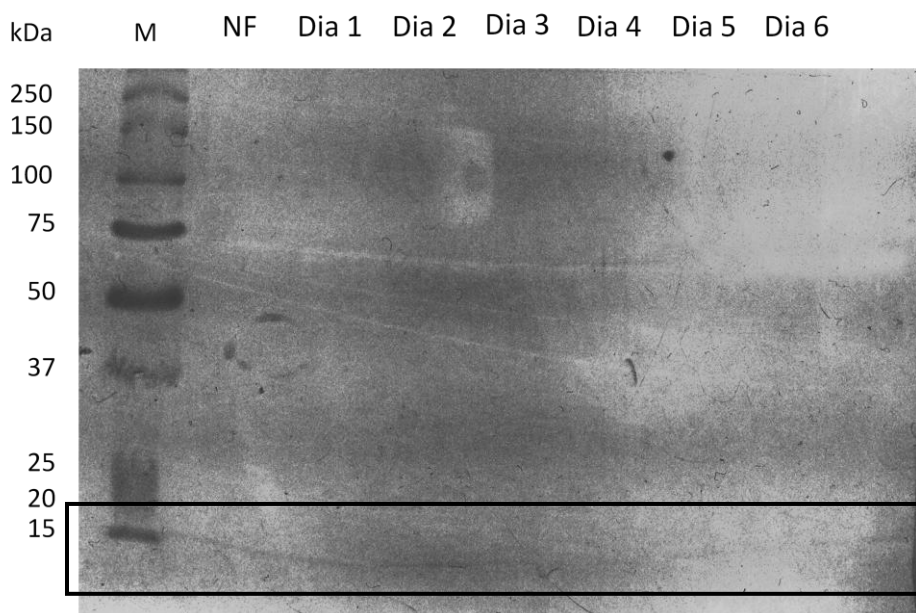


Figura 11 - Imagem representativa de uma zimografia reversa obtida por SDS-PAGE (12,5% m/v acrilamida, suplementado com 10% m/v gelatina e $1 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de MMP-9). Em cada coluna do gel foi adicionada a fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite colhida ao longo dos seis dias de fermentação. Coluna M: marcadores de massa molecular (kDa). Os polipéptidos do gel foram corados com Coomassie G.

Como se pode observar pela Figura 11, denota-se uma zona que parece ser resistente à ação da MMP-9 ou inibitória da sua atividade, com uma massa molecular de 15 kDa e que se mantém ao longo de todos os dias de fermentação sendo, no entanto, mais marcada do dia 0 ao dia 3.

Podemos, então, constatar que, de acordo com as zimografias reversas realizadas com a enzima comercial MMP-9, existem frações no soro de leite de mistura que parecem ser resistentes à ação da MMP-9 ou inibitórias da sua atividade. No entanto, comparando estes resultados com os resultados do ensaio

da atividade gelatinolítica (Figuras 6 e 7), uma vez que o soro de mistura não parecia inibir a atividade desta enzima, podemos inferir que estas frações poderão ser apenas resistentes à MMP-9. No entanto, e apesar de não ter significado estatístico, observou-se um ligeiro grau de inibição no Dia 0 da amostra total no ensaio da atividade gelatinolítica (Figura 6) o que poderá indicar que a banda observada no Dia 0 na zimografia reversa da amostra total (Figura 10) poderá ser inibidora da MMP-9.

4.4.2. Zimografia reversa com MMP-2

Posteriormente também se realizou a zimografia reversa com a enzima de origem comercial MMP-2 tanto para a amostra total como para a fração de baixa massa molecular do soro de leite de mistura, representadas respetivamente na Figura 12 e na Figura 13.



Figura 12 - Imagem representativa de uma Zimografia reversa obtida por SDS-PAGE (12,5% m/v acrilamida, suplementado com 10% m/v gelatina e $1 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de MMP-2). Em cada coluna do gel foi adicionada amostra total do soro de leite colhida ao longo dos seis dias de fermentação. Coluna M: marcadores de massa molecular (kDa). Os polipéptidos do gel foram corados com Coomassie G.

Como é observável na Figura 12, existe uma fração na amostra total que parece ser resistente à ação da ou inibidora da atividade da MMP-2. Esta apresenta uma massa molecular de 150 kDa e apenas está presente no soro não fermentado (Dia 0).

Não apresentando mais nenhuma fração, também com esta gelatinase se repetiu a zimografia reversa com a fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite de mistura ao longo da fermentação, uma vez que esta apresenta uma maior concentração das frações de baixa massa molecular quando comparada com a amostra total do soro.

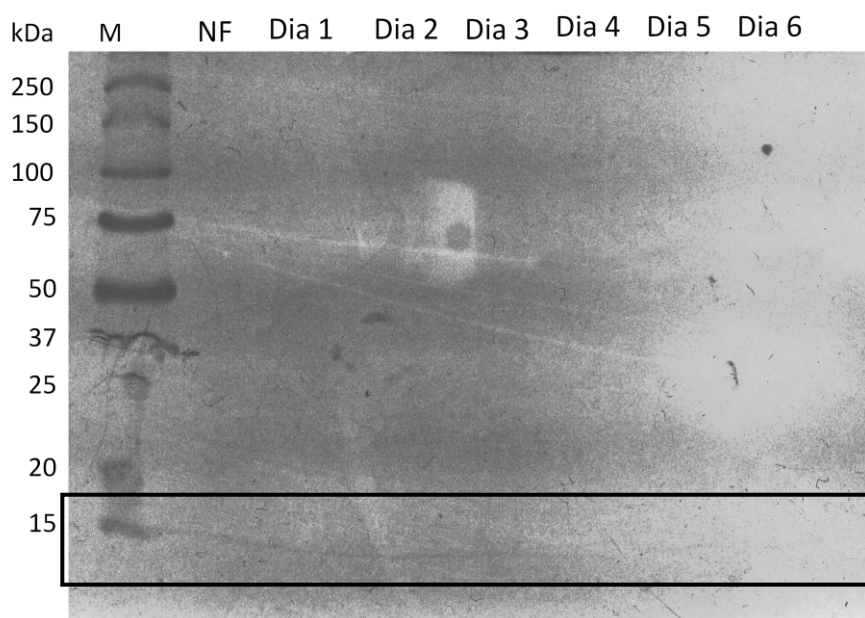


Figura 13 - Imagem representativa de uma zimografia reversa obtida por SDS-PAGE (12,5% m/v acrilamida, suplementado com 10% m/v gelatina e $1 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ de MMP-2). Em cada coluna do gel foi adicionada a fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite ao longo da fermentação. Coluna M: marcadores de massa molecular (kDa). Os polipéptidos do gel foram corados com Coomassie G.

Ao observar a Figura 13 podemos constatar que a mesma fração com massa molecular de 15 kDa, que aparece na zimografia reversa realizada com a

MMP-9, está presente e parece ser resistente à ação da MMP-2 ou inibidora da sua atividade.

Estes resultados também parecem ser coincidentes com os resultados obtidos no ensaio da atividade gelatinolítica (Figuras 8 e 9) uma vez que nestes se observava uma inibição na atividade da MMP-2, principalmente na fração compreendida entre 3 e 10 kDa. Deste modo, podemos inferir que a fração que se observa na zimografia reversa poderá ser inibidora da atividade da MMP-2.

4.5. Ensaios celulares

Ao longo dos anos tem-se verificado que as MMPs desempenham um papel crucial na remodelação dos tecidos e no desenvolvimento dos órgãos devido à sua função no rearranjo da matriz extracelular. No entanto, apesar desta função essencial, as MMPs também se encontram associadas a processos patológicos uma vez que estas contribuem para a progressão tumoral, quando a sua função ou expressão se encontra alterada⁽⁸⁰⁾.

Após constatar que o soro do leite de mistura parece ter um efeito inibidor da atividade das gelatinases, principalmente da MMP-2, passou-se para os ensaios celulares de invasão e proliferação celular. Estes foram realizados utilizando a linha celular HT-29.

4.5.1. Proliferação celular

A proliferação celular das células estaminais é um fator muito importante nas fases ativas do desenvolvimento e durante a regeneração dos tecidos. No entanto, a proliferação celular desregulada é uma característica das células tumorais. As MMPs têm a capacidade de influenciar a proliferação celular tanto nos processos fisiológicos, como no microambiente tumoral, uma vez que estas

podem alterar a biodisponibilidade e a funcionalidade de vários fatores de crescimento reguladores^(15, 80, 81). Um exemplo é a ativação proteolítica do TGF β pelas gelatinases que, numa situação cancerígena, vai ter um efeito de indução tumoral⁽⁸⁰⁾. Outro caso é a libertação do fator de crescimento VEGF, pela enzima MMP-9, que estimula a angiogénese tanto em condições fisiológicas como durante o desenvolvimento tumoral⁽¹⁵⁾.

Deste modo, para estudar o efeito do soro de leite como potencial inibidor das gelatinases e, conseqüentemente da proliferação celular, realizou-se o ensaio com MTT. Este permite avaliar a viabilidade celular das células HT-29 após a adição do soro de leite. Os resultados encontram-se ilustrados nas Figuras 14 e 15.

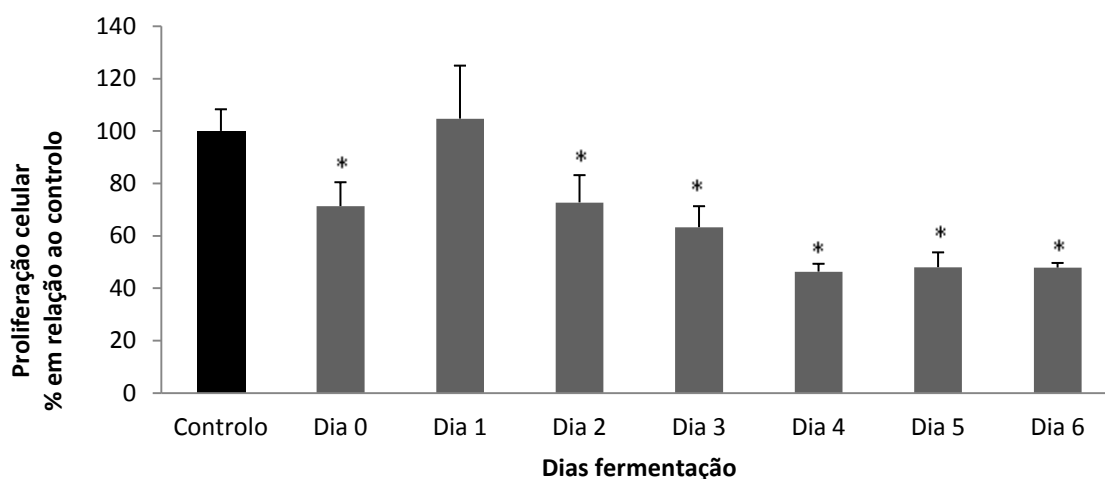


Figura 14 – Percentagem de proliferação celular das células HT-29 em relação ao controlo após adição da amostra total do soro de leite de mistura colhida durante a fermentação. Os valores são apresentados em média \pm desvio padrão; * $p \leq 0,05$ vs. controlo.

Ao realizar o ensaio com a amostra total do soro foi adicionado o volume correspondente a 100 μ g de proteína às células HT-29. Como se pode observar na Figura 14, a amostra total apresentou uma inibição da proliferação celular, com significado estatístico ($p \leq 0,05$), exceto no soro com 1 dia de fermentação (Dia 1).

Esta inibição foi aumentando ao longo dos dias de fermentação apresentando os seguintes valores: Dia 0 – 29%, Dia 2 – 27%, Dia 3 – 37%, Dia 4 – 54%, Dia 5 – 52%, Dia 6 – 52%. Apesar do aumento da inibição coincidir com o aumento da libertação dos péptidos bioativos, também é coincidente com o aumento do ácido láctico que, por ser um ácido, diminui por si só o crescimento celular.

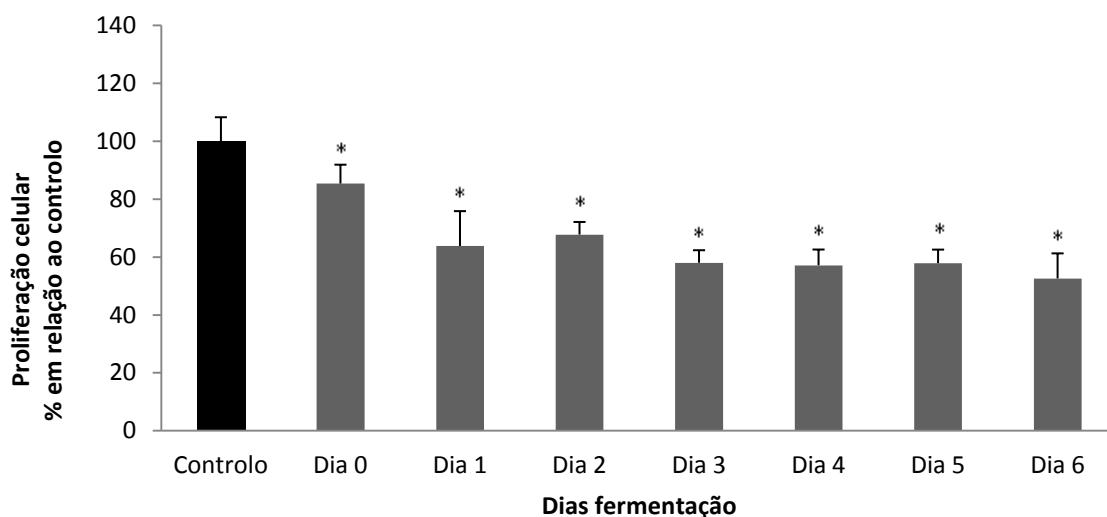


Figura 15 – Percentagem de proliferação celular das células HT-29 em relação ao controlo após adição da fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite colhida ao longo da fermentação. Os valores são apresentados em média \pm desvio padrão; * $p \leq 0,05$ vs. controlo.

Posteriormente realizou-se o ensaio da proliferação celular com a fração molecular com massas compreendidas entre 3 e 10 kDa que, por ter passado no ultrafiltrador de 3 kDa, se encontra desprovida de ácido láctico. Ao observar a Figura 15 é possível constatar que também esta fração inibe a proliferação celular, com significado estatístico ($p \leq 0,05$), e que esta vai aumentando ao longo dos dias de fermentação. Assim, quando comparado com o controlo, a fração de baixa massa molecular do soro de leite de mistura apresenta os seguintes valores de inibição: Dia 0 – 15%, Dia 1 – 36%, Dia 2 – 32%, Dia 3 – 42%, Dia 4 – 43%, Dia 5 – 42% e Dia 6 – 47%.

Este aumento da inibição da proliferação celular ao longo dos dias de fermentação na fração desprovida de ácido láctico poderá indicar que esta atividade se deve realmente aos péptidos bioativos produzidos durante a fermentação. Além disso, estes resultados também sugerem que existe uma fração no soro não fermentado (Dia 0) que inibe a proliferação celular e tem um maior efeito na amostra total do soro.

4.5.2. Invasão celular

O comportamento invasivo das células é essencial para que ocorra um desenvolvimento saudável e a formação dos órgãos. No entanto, quando as células tumorais possuem este comportamento, levam à formação de metástases. As metástases estão associadas a um mau prognóstico em todos os tipos de cancro devido à sua disseminação e consequente formação de tumores secundários, deste modo, é essencial a sua prevenção. Uma vez que promovem a migração celular e invasão tumoral devido à sua capacidade de degradar proteoliticamente os componentes da MEC e da membrana basal, a inibição das MMPs é um método interessante na prevenção e terapêutica da doença oncológica. Deste modo, e uma vez que os resultados anteriores demonstraram uma possível inibição da atividade das gelatinases por parte do soro de leite, realizou-se o *wound assay* de modo a verificar o seu efeito na invasão celular.

Para a realização deste ensaio realizou-se um corte na monocamada celular e, posteriormente, foi adicionada a amostra em estudo, ou seja, o possível inibidor. O volume de soro adicionado foi o correspondente a 100 µg de proteína. Os resultados encontram-se ilustrados nas Figuras 16 e 17.

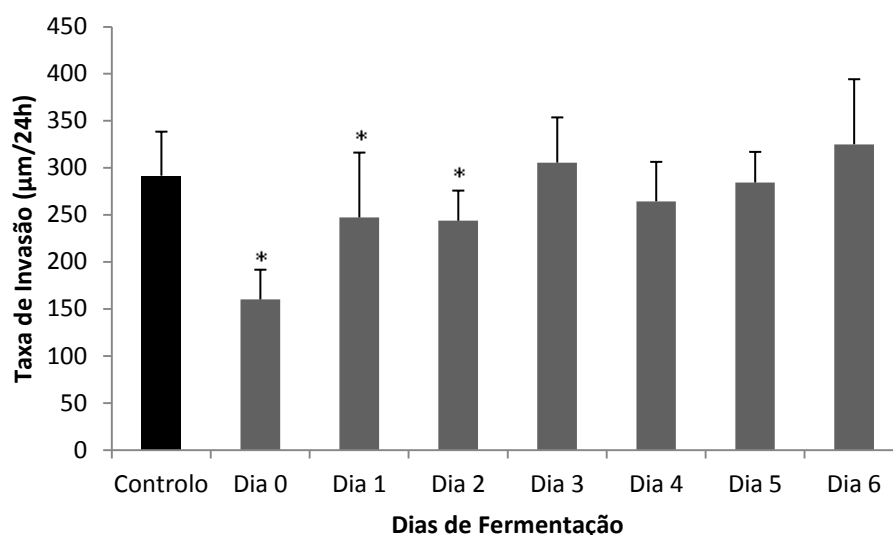


Figura 16 – Taxa de invasão celular, em relação ao controlo, após o corte da monocamada de células HT-29 na presença da amostra total do soro de leite ao longo da fermentação, após 48 h. Os valores são apresentados em média \pm desvio padrão; * $p \leq 0,05$ vs. Controlo.

Ao analisar a Figura 16 é possível constatar que existe uma diferença no nível de invasão celular entre os vários dias de fermentação do soro e, ainda, em relação ao controlo. Como é possível observar, o dia em que a taxa de invasão é mais baixa é o Dia 0, ou seja, o dia em que o soro do leite não se encontra fermentado. Após a adição do soro de leite de mistura NF, as células apresentaram uma taxa de invasão de 160 $\mu\text{m}/24\text{ h}$ valor que, quando comparado com a taxa de invasão do controlo demonstrou ter uma diferença significativa ($p \leq 0,05$). Ao observar a taxa de invasão dos dias em que o soro de leite foi fermentado podemos constatar que os dias 1, 2, 4 e 5 parecem ter um valor mais baixo, quando comparados com o controlo. No entanto, apenas o primeiro e o segundo dia de fermentação (Dia 1 e Dia 2, respetivamente) apresentam uma taxa de invasão média significativamente diferente do controlo ($p \leq 0,05$).

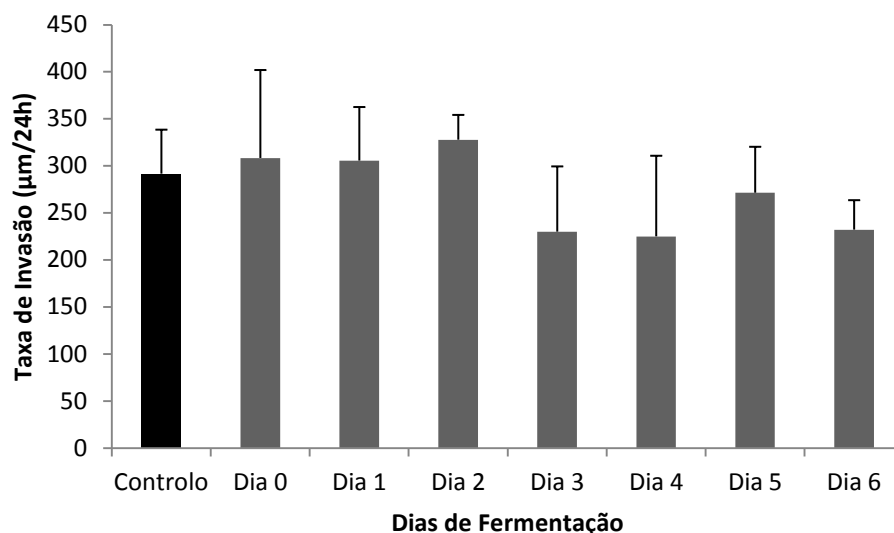


Figura 17 – Taxa de invasão celular, em relação ao controlo, após o corte da monocamada de células HT-29 na presença da fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite ao longo da fermentação, após 48 h. Os valores são apresentados em média \pm desvio padrão; * $p \leq 0,05$ vs. Controlo.

Ao realizar o ensaio com a fração de baixa massa molecular (3 a 10 kDa) do soro de leite, é observável através da Figura 17, que os dias em que houve uma menor taxa de invasão foram os dias 3, 4, 5 e 6. Estes apresentaram uma taxa de invasão de 230, 225, 271 e 232 $\mu\text{m}/24\text{ h}$, respetivamente. No entanto, estes valores não apresentaram uma diferença significativa quando comparados com a taxa de invasão média do controlo.

As Figuras 18 e 19 ilustram exemplos de migração celular após o corte da monocamada de células HT-29, na presença da amostra proteica total e da fração de baixa massa molecular do soro de leite de mistura, ao longo da fermentação.

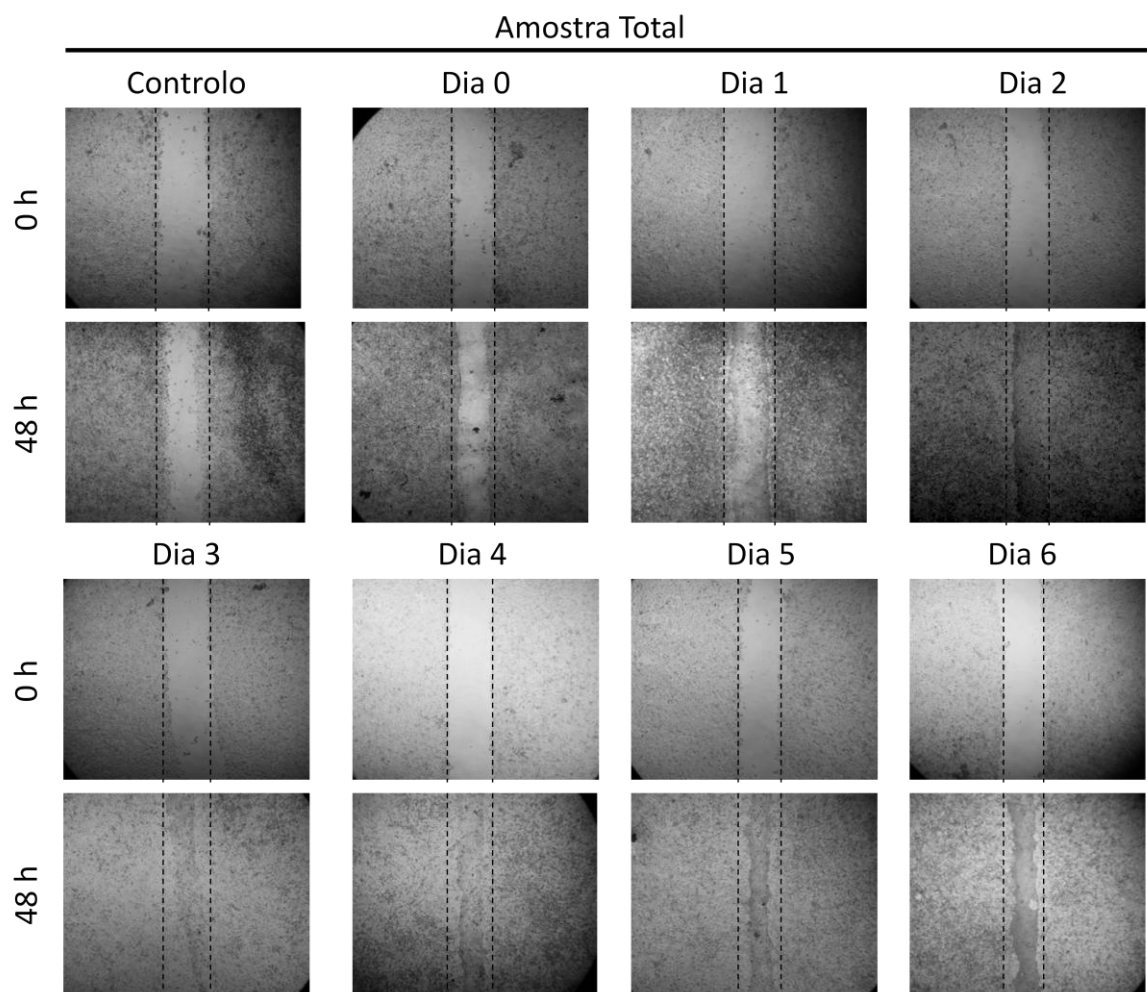


Figura 18 – Exemplos de migração celular, na presença da amostra total do soro de leite de mistura ao longo dos seis dias de fermentação, após o corte da monocamada de células HT-29, após 48 h.

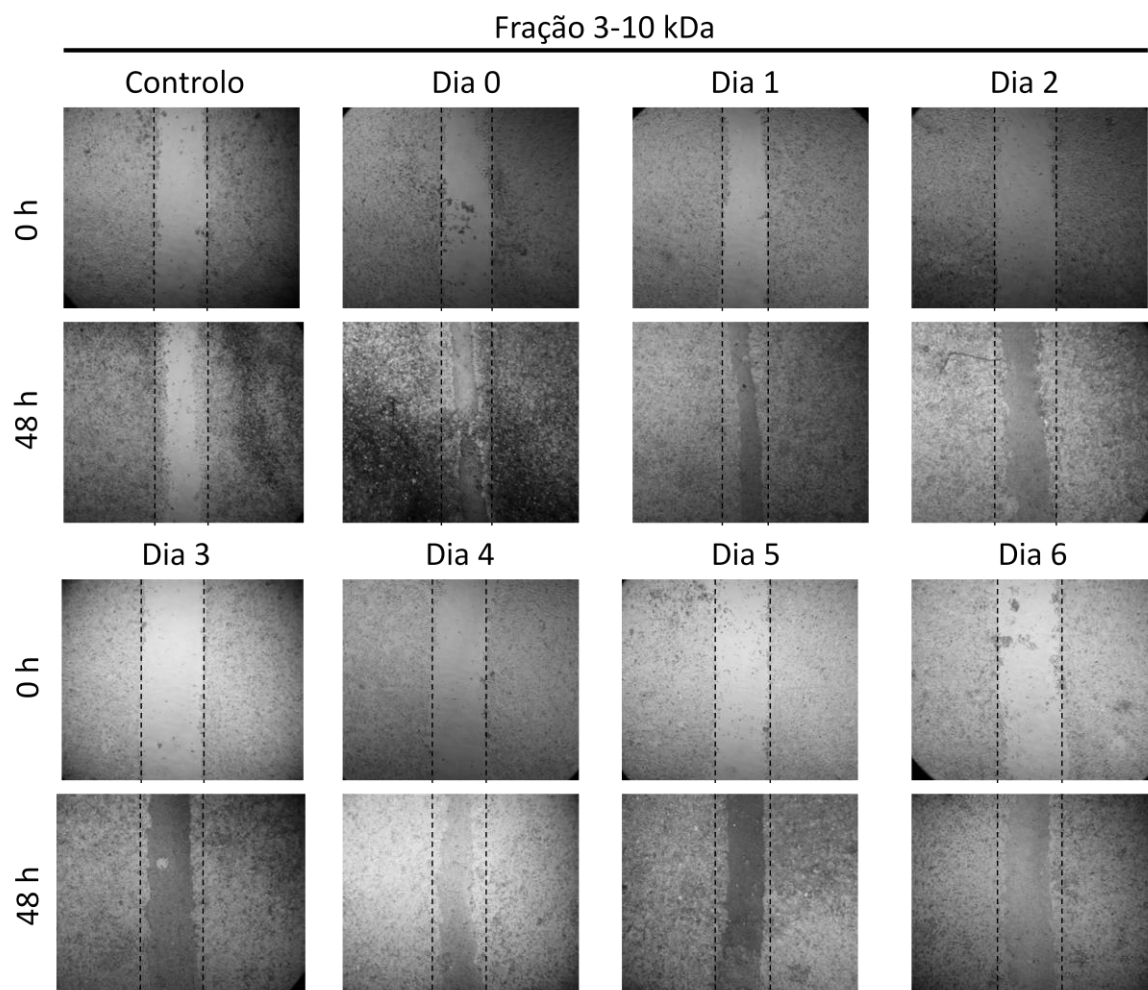


Figura 19 - Exemplos de migração celular, na presença da fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite de mistura ao longo dos seis dias de fermentação, após o corte da monocamada de células HT-29, após 48 h.

Após analisar os resultados podemos então constatar que o soro de leite parece ter uma atividade inibitória na proliferação e invasão celular, que parece ser coincidente com a formação dos péptidos bioativos. No entanto, o soro não fermentado (Dia 0) também parece apresentar esta atividade inibitória o que indica que o soro também poderá ter uma fração com efeito na invasão e proliferação celular. Contudo, será este efeito devido à inibição das metaloproteinases de matriz?

Para poder responder a esta questão foi-se estudar a atividade gelatinolítica do meio das células HT-29 com a presença do inibidor e, para isso, realizaram-se os seguintes ensaios: zimografia gelatinolítica e ensaio da atividade gelatinolítica do meio.

4.5.3. Zimografia gelatinolítica

As gelatinases presentes no meio extracelular recolhido do ensaio da invasão celular foram avaliadas através de uma zimografia gelatinolítica. Deste modo, foram realizadas duas zimografias, uma com a amostra total do soro de leite e outra com a fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa (Figuras 20 e 21).

Com este ensaio pretendia-se ver se as gelatinases presentes no meio extracelular se encontravam inativas na presença da amostra. Neste caso, ao realizar a eletroforese, as MMPs não conseguiriam degradar a gelatina presente no gel.

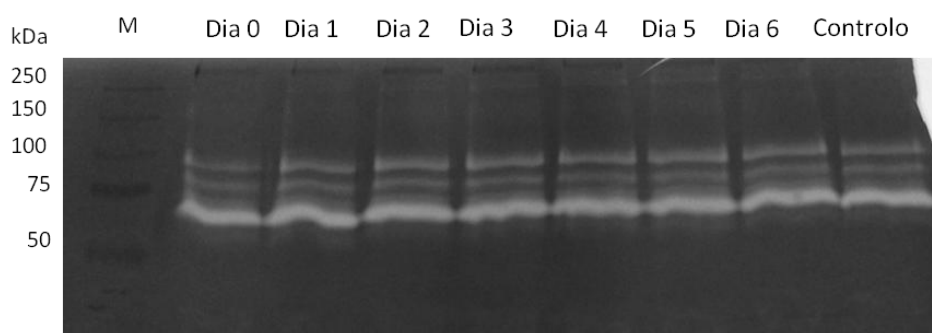


Figura 20 – Imagem representativa da zimografia gelatinolítica obtida por SDS-PAGE (12,5% m/v acrilamida, suplementado com 10% m/v de gelatina). Meio extracelular das células HT-29 recolhido após ensaio da invasão celular com adição de inibidor: amostra total do soro de leite de mistura ao longo da fermentação. Coluna M: marcadores de massa molecular (kDa). O gel foi corado com Coomassie G.

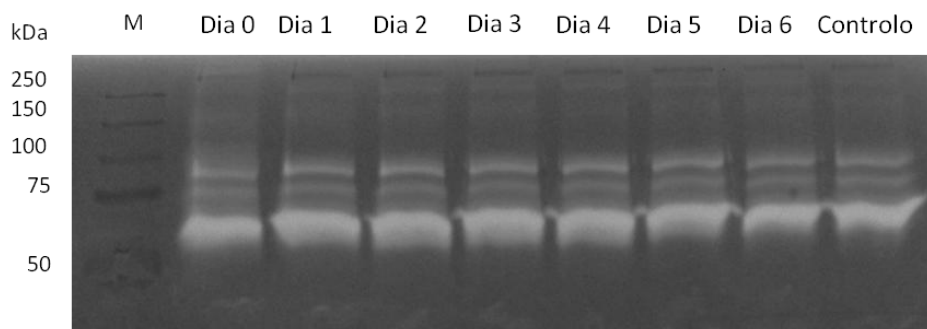


Figura 21 - Imagem representativa da zimografia gelatinolítica obtida por SDS-PAGE (12,5% m/v acrilamida, suplementado com 10% m/v de gelatina). Meio extracelular das células HT-29 recolhido após ensaio da invasão celular com adição de inibidor: fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite de mistura ao longo da fermentação. Coluna M: marcadores de massa molecular (kDa). O gel foi corado com Coomassie G.

As zimografias representadas pelas Figuras 20 e 21 demonstram que o meio extracelular das células HT-29, recolhido após o ensaio da invasão celular, contém várias espécies gelatinolíticas que correspondem à MMP-2 ativa (64 kDa), à pro-MMP-2 (72 kDa), à MMP-9 (83 kDa) e à pro-MMP-9 (92 kDa)^(15, 79). Ao comparar o controlo com as amostras onde foi adicionado soro de leite, podemos observar que não houve uma diminuição da atividade destas enzimas, exceto no soro não fermentado (Dia 0). O soro não fermentado apresentou uma diminuição de 10% na amostra total e de 13 % na fração molecular compreendida entre 3 e os 10 kDa, quando comparado com o respetivo controlo. A intensidade das bandas da MMP-2 ativa, da pro-MMP-2, da MMP-9 ativa e da pro-MMP-9 do meio contendo a amostra foram medidas por densitometria e os valores normalizados em relação ao controlo (meio extracelular sem presença da amostra). Estes resultados indicam que as gelatinases presentes no meio extracelular degradaram a gelatina presente no gel, ou seja, que as gelatinases se encontravam ativas. Porém, apesar destes resultados demonstrarem que as gelatinases se encontravam ativas na presença da amostra, o soro do leite demonstrou uma

inibição na invasão e proliferação celular. Para tentar perceber melhor o mecanismo subjacente a esta inibição, realizou-se ainda outro ensaio para avaliar a atividade gelatinolítica do meio extracelular.

4.5.4. Atividade gelatinolítica com meio extracelular das células HT-29

Realizou-se então o ensaio de avaliação da atividade gelatinolítica com o meio extracelular extraído das células HT-29. Para isso foram adicionados 100 μ L do meio extracelular e 100 μ L do substrato gelatina DQ, de modo a observar novamente se as gelatinases presentes no meio iriam ou não degradar o substrato, ou seja, se estavam ou não ativas. Os resultados encontram-se ilustrados nas Figuras 22 e 23.

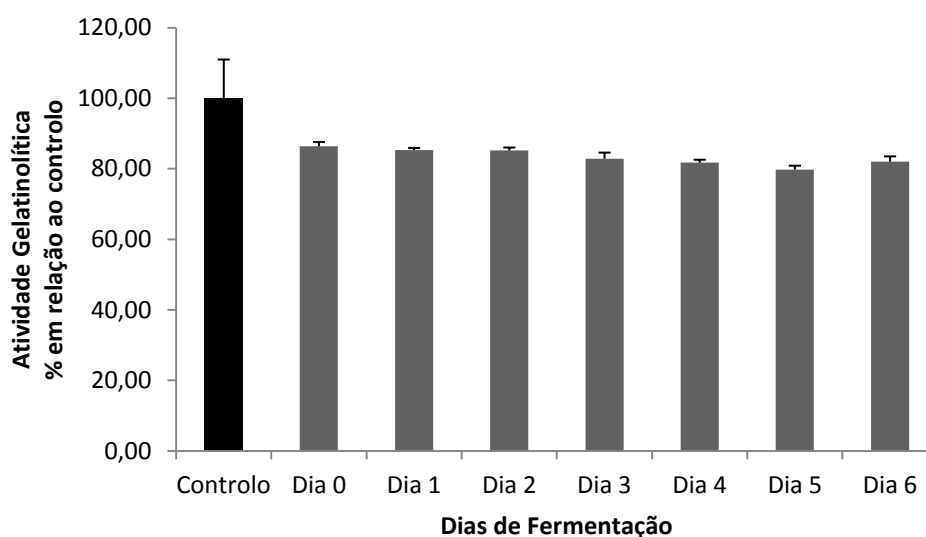


Figura 22 – Atividade gelatinolítica (% em relação ao controlo) do meio extracelular, das células HT-29, com amostra total do soro de leite de mistura ao longo da fermentação. Os valores são apresentados em média \pm desvio padrão; * $p \leq 0,05$ vs. Controlo.

Ao juntar o meio extracelular que continha, como inibidor, a amostra total do soro do leite, podemos observar pela Figura 22 que houve um ligeiro grau de inibição da degradação da gelatina pelas gelatinases existentes no meio. No

entanto, além de ter sido uma ligeira inibição também não teve uma diferença significativa quando comparada com o controle.

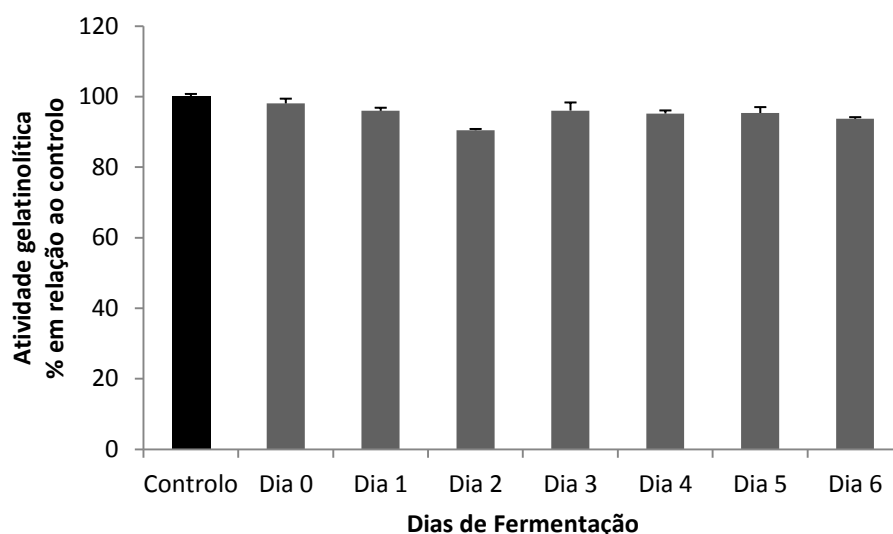


Figura 23 – Atividade gelatinolítica (% em relação ao controle) do meio extracelular, das células HT-29, com fração molecular compreendida entre 3 e 10 kDa do soro de leite de mistura ao longo da fermentação. Os valores são apresentados em média \pm desvio padrão; * $p \leq 0,05$ vs. controle.

Ao realizar o mesmo ensaio com a fração de baixa massa molecular do soro de leite (3 a 10 kDa) é possível observar, através da Figura 23, que esta fração não apresenta inibição da atividade gelatinolítica.

Deste modo, é possível constatar que, uma vez que houve degradação do substrato gelatina DQ, as gelatinases presentes no meio extracelular, retirado do ensaio da invasão celular, se encontravam ativas na presença das amostras estudadas.

Assim, analisando os resultados de ambos os ensaios, da zimografia gelatinolítica e da atividade gelatinolítica com o meio extracelular, podemos constatar que as gelatinases presentes no meio se encontravam ativas na presença do soro de leite. No entanto, quando adicionado nos ensaios da

proliferação e invasão celular, o soro do leite apresentou realmente uma inibição destas atividades. Esta situação poderá ter duas explicações.

Por um lado, a inibição apresentada nos ensaios da invasão e proliferação celular poderá ser devido à inibição das MMPs. No entanto, a ligação entre o inibidor e a enzima (MMP) poderá não ser uma ligação covalente e, deste modo, ser reversível. Neste caso, ao realizar a zimografia gelatinolítica, o complexo inibidor-enzima, em contacto com o SDS presente no gel, poderá ter-se separado ficando assim a enzima disponível para degradar o substrato. Neste caso, a inibição que ocorreu nos ensaios da invasão e proliferação celular poder-se-á dever realmente à inibição das gelatinases.

Por outro lado, a inibição que ocorreu na invasão e proliferação celular com a adição do soro do leite poderá não estar relacionada com a inibição das MMPs. Apesar dos ensaios realizados sugerirem que, *in vitro*, o soro do leite tem inibição nas gelatinases, principalmente na MMP-2, a concentração adicionada nos ensaios da invasão e proliferação celular, 100 µg de proteína por 100 µL, pode não ter sido suficiente para ter efeito ou, em ensaios celulares não ocorrer o mesmo efeito inibitório que se verifica nos *kits* com as enzimas com origem comercial. A inibição da invasão e proliferação celular pode ocorrer devido a outros mecanismos que não a inibição das metaloproteinases de matriz. A atividade das lectinas, por exemplo, que podem reconhecer o glicoma alterado na superfície das células tumorais malignas e levar eventualmente à morte celular programada por apoptose e autofagia, pode ser reconhecida como terapia antineoplásica⁽⁸²⁾. Estudos realizados por outros trabalhos no nosso laboratório (dados não mostrados) com o soro de leite (do Dia 0 ao Dia 3) constataram que as suas proteínas e polipéptidos têm a capacidade de se ligarem às membranas

das células HT-29. Esta poderá ser então outra possível explicação para os resultados obtidos, o que poderá até explicar porque é que a inibição é maior na proliferação celular quando comparada com a invasão.

4.6. Avaliação do potencial bioativo do soro de leite no cancro colorctal – Considerações finais

Como acima descrito, a fermentação do soro de leite resulta na hidrólise das parcial ou total das suas principais proteínas, podendo provocar a libertação e consequente acumulação de sequências peptídicas específicas com efeitos benéficos para a saúde.

Como descrito por vários autores, as proteínas do soro e do seu hidrolisado têm um efeito redutor na incidência de tumores intestinais em animais^(58, 59, 61-64), no entanto, o mecanismo subjacente ainda se encontra por esclarecer.

Como se pode constatar pelos resultados apresentados neste trabalho, o soro de leite, fermentado e não fermentado, pareceu de facto ter um efeito na inibição das gelatinases, principalmente na MMP-2.

Começando por analisar os resultados do soro de leite não fermentado (Dia 0), podemos constatar que este apresentou uma inibição da atividade da MMP-2, não tendo acontecido o mesmo com a MMP-9. O soro não fermentado também apresentou uma inibição da invasão celular; contudo, esta apenas ocorreu com a amostra total e não com a fração de baixa massa molecular. Relativamente à proliferação celular, esta também sofreu uma inibição, mais marcada na amostra total quando comparada com a fração de 3 a 10 kDa. Isto indica que esta atividade inibitória poderá ser devida às proteínas de elevada massa molecular existentes apenas no Dia 0: a LF, a BSA ou, ainda, as imunoglobulinas. Após

análise dos cromatogramas obtidos por HPLC, é possível comprovar que tanto a BSA como a LF desaparecem logo durante o primeiro dia de fermentação. Isto sugere que a atividade inibitória da invasão e proliferação celular poderá estar relacionada com estas proteínas, uma vez que apenas estão presentes no Dia 0. Estes resultados são coincidentes com estudos já realizados com a LF e a BSA, anteriormente descritos, tendo a LF, bem como o péptido resultante da sua hidrólise parcial, a lactoferricina, demonstrado uma atividade citotóxica para diferentes tipos de linhas celulares⁽⁸³⁻⁸⁶⁾ e a BSA apresentado um efeito de inibição da proliferação celular ao inibir o crescimento de uma linha celular do cancro da mama⁽⁵⁰⁾.

Relativamente ao soro de leite fermentado constatou-se que este não teve efeito na inibição da atividade da MMP-9. No entanto, relativamente à MMP-2, a amostra total demonstrou uma ligeira inibição da atividade desta enzima e a amostra entre os 3-10 kDa demonstrou uma inibição ainda mais elevada em comparação à primeira. Estes resultados sugerem que os polipéptidos libertados durante a fermentação poderão ter um efeito inibitório da enzima MMP-2 e, deste modo, o processo fermentativo realizado durante 6 dias demonstra trazer benefícios no efeito anti-tumoral do soro do leite.

Ao estudar o seu efeito na invasão celular constatou-se que apenas a fração de baixa massa molecular, e nos últimos dias de fermentação, é que demonstrava uma ligeira inibição nesta atividade contudo, sem significado estatístico. Por outro lado, a inibição da proliferação celular aumentou ao longo dos dias da fermentação do soro e foi consistente tanto para a amostra total como para a fração entre os 3 e 10 kDa, tendo sido maior na última. Estes dados sugerem que os polipéptidos libertados pela fermentação do soro do leite têm um

68

efeito na inibição da proliferação celular e na invasão celular. Estes resultados vão ao encontro da ação já conhecida da α -LA, que demonstrou possuir um efeito anti-proliferativo em linhas celulares de adenocarcinomas do cólon (HT-29)⁽⁴⁹⁾. Estes resultados parecem então sugerir que os péptidos libertados durante a sua hidrólise poderão exercer o mesmo efeito.

Estes resultados são coincidentes com os resultados obtidos por Kimora e colegas (2014) que, ao estudarem o efeito das proteínas do soro de leite nas mudanças cutâneas induzidas por radiação ultravioleta B (UVB), observaram que havia uma redução significativa da MMP-2 ativa após a administração oral das proteínas do soro. Também observaram que existia inibição da pro-MMP-9. Concluíram então que as proteínas do soro do leite preveniam a degradação do colagénio tipo IV, a angiogénese, proliferação e o dano no ADN causados pela radiação UVB⁽⁸⁷⁾.

Deste modo, a fermentação do soro de leite pelas BAL e consequente uso pode ser uma forma interessante e alternativa à eliminação do soro do leite, que tem vindo a levantar tantos problemas. Como podemos constatar pelos resultados deste estudo e de outros já realizados, o processo fermentativo realizado durante 6 dias parece levar à libertação de vários péptidos bioativos – como podemos observar no perfil proteico do soro e nos cromatogramas obtidos por HPLC, que têm diferentes sensibilidades. Este aumento da libertação de péptidos bioativos é coincidente com a inibição da MMP-2, com a inibição da invasão celular e, principalmente, com a inibição da proliferação celular. Estes resultados são coincidentes com os resultados obtidos por Rachid e colegas (2006) que constataram que leite fermentado com *L. helveticus* diminuía o crescimento de tumores mamários em ratos⁽⁵⁴⁾ ou, ainda, os resultados obtidos por Biffi e colegas

(1997) que demonstraram um efeito anti-proliferativo do leite fermentado por BAL numa linha celular do cancro da mama, tendo associado este efeito a um composto solúvel produzido pelas bactérias lácticas durante o processo fermentativo⁽⁵⁷⁾.

Além disso, a fermentação do soro leva a um maior valor nutricional. Além da capacidade anticancerígena das suas proteínas e péptidos, a degradação das principais proteínas faz com que estas não tenham o seu potencial alergénico, tenham uma maior digestibilidade e haja um aumento no conteúdo de aminoácidos livres. Além disso, as BAL têm a capacidade de diminuir a concentração de lactose presente no meio ⁽⁷²⁾.

No entanto, os benefícios do soro do leite fermentado não se devem apenas à formação dos péptidos bioativos. Devido ao seu importante papel na prevenção do CCR, as BAL têm vindo a ser estudadas como potencial método terapêutico, uma vez que estas inibem a iniciação e progressão da carcinogénese por diversos mecanismos. Alguns estudos demonstram que as BAL têm um papel na regulação da apoptose celular por vias intrínsecas e extrínsecas, um mecanismo potencialmente crítico na prevenção do CCR. Além disso, encontram-se envolvidas em mais mecanismos celulares e moleculares que estão envolvidos na prevenção do CCR como efeitos anti-oxidantes, respostas imunes ou, ainda, através da epigenética⁽⁵²⁾.

Assim, é possível constatar com este trabalho, que o processo fermentativo é benéfico quando realizado no soro do leite de mistura e quando este ocorre durante 6 dias.

No entanto, é preciso ter em consideração determinados fatores que poderão ser importantes no uso das proteínas e polipéptidos do soro de leite na prevenção ou terapêutica da doença oncológica.

Em primeiro lugar é importante estudar a sua digestibilidade e biodisponibilidade. Os péptidos bioativos são péptidos que têm uma atividade de tipo hormonal ou medicamentosa e que têm a capacidade de modular funções fisiológicas através da sua ligação a recetores específicos nas células alvo⁽⁷⁴⁾. No entanto não é possível estabelecer uma relação direta entre a atividade obtida em ensaios *in vitro* e os mecanismos destes péptidos *in vivo*. A digestão, que desempenha um papel chave na formação, mas também, na degradação dos péptidos bioativos, e a sua absorção no trato gastrointestinal são essenciais e determinantes para que ocorra o seu efeito no organismo. Esta questão tem sido bastante estudada em relação aos péptidos bioativos com atividade anti-hipertensiva tendo já vários estudos demonstrado que estes são absorvidos, exercendo assim a sua função no organismo⁽⁸⁸⁻⁹¹⁾. Esta questão é de extrema importância uma vez que o grande impedimento para que as proteínas e os péptidos possam modular os processos de carcinogénese é a sua suscetibilidade relativamente à digestão gastrointestinal, o que resulta na redução dos seus efeitos bioativos⁽⁹²⁾.

Outro fator importante a ter em consideração reside na própria inibição das MMPs. Como já descrito os primeiros ensaios clínicos a serem realizados com os primeiros inibidores sintéticos das MMPs (MMPIs) não tiveram sucesso uma vez que os resultados foram ineficazes e apresentaram efeitos secundários prejudiciais^(93, 94). Uma vez que vários estudos tinham demonstrado a importância das MMPs como alvo para o desenvolvimento de novas terapêuticas anti-

tumorais, estes resultados adversos foram inesperados. Após análise, estes resultados foram atribuídos ao facto dos MMPs desenvolvidos inicialmente serem de amplo espectro e, ainda, devido ao conhecimento limitado da grande variedade de funções biológicas atribuídas às MMPs⁽⁹⁵⁾. Deste modo, é essencial estudar o impacto proteolítico que o soro do leite poderá ter a nível sistémico. No entanto, e como já acima indicado, a maioria dos estudos que procura desenvolver novas terapêuticas anti-tumorais com vista no desenvolvimento de inibidores específicos das MMPs procuram, preferencialmente, inibidores que atuem *in loco*. Assim, e uma vez que estamos a estudar o cancro do cólon espera-se ultrapassar os problemas encontrados com os primeiros MMPs.

5. Conclusão

Após a realização deste estudo foi possível constatar que o soro do leite fermentado tem um potencial bioativo no cancro do cólon. Os resultados parecem indicar que, *in vitro*, existem péptidos bioativos no soro do leite que são libertados por hidrólise parcial das suas proteínas precursoras durante o processo fermentativo e que aparentam ter uma atividade inibitória das metaloproteinases de matriz, principalmente da MMP-2.

Também foi possível demonstrar que, quando adicionado às células tumorais do cancro do cólon, HT-29, o soro do leite teve um efeito benéfico ao inibir tanto a proliferação como a invasão celular. No entanto, estes efeitos não pareceram dever-se à inibição das MMPs presentes no meio extracelular, o que pode ter acontecido devido a uma inibição reversível por parte do soro, ou devido à utilização de uma baixa concentração proteica ou, ainda, porque exercia outro tipo de mecanismo que não apenas a inibição das MMPs estudadas.

É possível concluir por análise destes resultados que o soro de leite fermentado demonstrou possuir um potencial bioativo anti-tumoral para o cancro do cólon, quer pela inibição das gelatinases, quer pela redução do crescimento tumoral. Isto demonstra que este alimento deverá ser mais estudado para ser potencialmente considerado o seu uso na prevenção desta doença oncológica ou como terapêutica adjuvante.

Além disso, através deste trabalho é possível associar quais as frações correspondentes aos dias em que o soro de leite demonstrou possuir uma maior atividade anti-tumoral, bem como identificar vários picos de polipéptidos que

poderão ser responsáveis por tais atividades. É então essencial como trabalho futuro colher estas frações e sequenciar estes péptidos por espectrometria de massa e, posteriormente, repetir os ensaios com cada um dos péptidos isolados, de modo a identificar o(s) péptido(s) específico(s) associado(s) às inibições observadas.

Concluindo, de acordo com os resultados deste estudo, o soro do leite fermentado parece ser uma mais-valia como terapêutica adjuvante da doença oncológica. Devido ao seu potencial, é então de extrema importância a realização de mais estudos, com a consequente passagem para de estudos *in vitro* para *in vivo*, de modo a que se obtenham resultados rigorosos sobre o efeito terapêutico deste alimento no cancro do cólon.

Referências Bibliográficas

1. Globocan. [atualizado em: 12/03/2015]. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
2. Baena R, Salinas P. Diet and colorectal cancer. Maturitas. 2015
3. Ralston RA, Truby H, Palermo CE, Walker KZ. Colorectal Cancer and Nonfermented Milk, Solid Cheese, and Fermented Milk Consumption: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. Crit Rev Food Sci Nutr. 2013; 54(9):1167-79.
4. Potter JD. Nutrition and colorectal cancer. Cancer Causes Control. 1996; 7(1):127-46.
5. Sandler RS. Epidemiology and risk factors for colorectal cancer. Gastroenterol Clin North Am. 1996; 25(4):717-35.
6. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research; Washington DC: AICR, 2007.
7. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J Natl Cancer Inst. 1981; 66(6):1191-308.
8. Ahmed FE. Effect of diet, life style, and other environmental/chemopreventive factors on colorectal cancer development, and assessment of the risks. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 2004; 22(2):91-147.

9. Shannon J, White E, Shattuck AL, Potter JD. Relationship of food groups and water intake to colon cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996; 5(7):495-502.
10. Murthy NS, Mukherjee S, Ray G, Ray A. Dietary factors and cancer chemoprevention: an overview of obesity-related malignancies. *J Postgrad Med.* 2009; 55(1):45-54.
11. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2000; 10(6):415-33.
12. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med.* 2015; 7(1):1-11.
13. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.* 1991; 51(18 Suppl):5054s-59s.
14. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000; 407(6801):249-57.
15. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids.* 2011; 41(2):271-90.
16. Wee Yong V, Forsyth PA, Bell R, Krekoski CA, Edwards DR. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci.* 1998; 21(2):75-80.
17. Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW, et al. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin α v β 3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2001; 263(2):209-23.
18. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; 33(10):960-70.

19. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(10):737-44.
20. Liabakk NB, Talbot I, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill F. Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1996; 56(1):190-6.
21. Kryczka J, Stasiak M, Dziki L, Mik M, Dziki A, Cierniewski C. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of the beta1 integrin ectodomain facilitates colon cancer cell motility. *J Biol Chem.* 2012; 287(43):36556-66.
22. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009; 22(4):191-7.
23. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *International journal of molecular sciences.* 2013; 14(8):16365-85.
24. Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases [10.1038/nrc1121]. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(7):489-501.
25. Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004; 23(1-2):101-17.
26. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1705(2):69-89.
27. Herszenyi L, Hritz I, Lakatos G, Varga MZ, Tulassay Z. The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences.* 2012; 13(10):13240-63.

28. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*. 2002; 295(5564):2387-92.
29. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*. 2005; 100(1-2):72-9.
30. Cho E, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Beeson WL, van den Brandt PA, Colditz GA, et al. Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: a pooled analysis of 10 cohort studies. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96(13):1015-22.
31. Huncharek M, Muscat J, Kupelnick B. Colorectal cancer risk and dietary intake of calcium, vitamin D, and dairy products: a meta-analysis of 26,335 cases from 60 observational studies. *Nutr Cancer*. 2009; 61(1):47-69.
32. Mettlin CJ, Schoenfeld ER, Natarajan N. Patterns of milk consumption and risk of cancer. *Nutr Cancer*. 1990; 13(1-2):89-99.
33. Madureira AR, Pereira CI, Gomes AMP, Pintado ME, Xavier Malcata F. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*. 2007; 40(10):1197-211.
34. Madureira AR, Tavares T, Gomes AM, Pintado ME, Malcata FX. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *J Dairy Sci*. 2010; 93(2):437-55.
35. Parodi PW. A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. *Curr Pharm Des*. 2007; 13(8):813-28.
36. Pepe G, Tenore GC, Mastrocinque R, Stusio P, Campiglia P. Potential anticarcinogenic peptides from bovine milk. *Journal of amino acids*. 2013; 2013:939804.
37. Lopez-Exposito I, Recio I. Protective effect of milk peptides: antibacterial and antitumor properties. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 606:271-93.

38. Source HSoPHN. [actualizado em: 12/03/2015]. Disponível em: <http://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/calcium-full-story/>.
39. Genkinger JM, Hunter DJ, Spiegelman D, Anderson KE, Arslan A, Beeson WL, et al. Dairy products and ovarian cancer: a pooled analysis of 12 cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15(2):364-72.
40. Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Milk, milk products and lactose intake and ovarian cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer.* 2006; 118(2):431-41.
41. Giovannucci E, Rimm EB, Wolk A, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Calcium and fructose intake in relation to risk of prostate cancer. *Cancer Res.* 1998; 58(3):442-7.
42. Giovannucci E, Liu Y, Platz EA, Stampfer MJ, Willett WC. Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer.* 2007; 121(7):1571-8.
43. Ganmaa D, Sato A. The possible role of female sex hormones in milk from pregnant cows in the development of breast, ovarian and corpus uteri cancers. *Med Hypotheses.* 2005; 65(6):1028-37.
44. Kosikowski FV. Whey Utilization and Whey Products¹. *J Dairy Sci.* 62(7):1149-60.
45. Ebringer L, Ferencik M, Krajcovic J. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products--review. *Folia Microbiol (Praha).* 2008; 53(5):378-94.
46. Pintado ME, Macedo AC, Malcata FX. Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. *Food Science and Technology International.* 2001; 7(2):105-16.

47. Chatterton DEW, Smithers G, Roupas P, Brodkorb A. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin—Technological implications for processing. *International Dairy Journal*. 2006; 16(11):1229-40.
48. Tsabouri S, Douros K, Priftis KN. Cow's milk allergenicity. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2014; 14(1):16-26.
49. Sternhagen LG, Allen JC. Growth rates of a human colon adenocarcinoma cell line are regulated by the milk protein alpha-lactalbumin. *Adv Exp Med Biol*. 2001; 501:115-20.
50. Laursen I, Briand P, Lykkesfeldt AE. Serum albumin as a modulator on growth of the human breast cancer cell line, MCF-7. *Anticancer Res*. 1990; 10(2a):343-51.
51. Shiby VK, Mishra HN. Fermented milks and milk products as functional foods--a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013; 53(5):482-96.
52. Zhong L, Zhang X, Covasa M. Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(24):7878-86.
53. Matar C, Nadathur SS, Bakalinsky AT, Goulet J. Antimutagenic effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* L89 and a protease-deficient derivative. *J Dairy Sci*. 1997; 80(9):1965-70.
54. Rachid M, Matar C, Duarte J, Perdigon G. Effect of milk fermented with a *Lactobacillus helveticus* R389(+) proteolytic strain on the immune system and on the growth of 4T1 breast cancer cells in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006; 47(2):242-53.
55. Belem MA, Gibbs BF, Lee BH. Proposing sequences for peptides derived from whey fermentation with potential bioactive sites. *J Dairy Sci*. 1999; 82(3):486-

56. Matar C, Valdez JC, Medina M, Rachid M, Perdigon G. Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. *J Dairy Res.* 2001; 68(4):601-9.
57. Biffi A, Coradini D, Larsen R, Riva L, Di Fronzo G. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutr Cancer.* 1997; 28(1):93-9.
58. McIntosh GH, Regester GO, Le Leu RK, Royle PJ, Smithers GW. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. *J Nutr.* 1995; 125(4):809-16.
59. Bounous G, Batist G, Gold P. Whey proteins in cancer prevention. *Cancer Lett.* 1991; 57(2):91-4.
60. Rosen M, Nystrom L, Wall S. Diet and cancer mortality in the counties of Sweden. *Am J Epidemiol.* 1988; 127(1):42-9.
61. Hakkak R, Korourian S, Ronis MJ, Johnston JM, Badger TM. Dietary whey protein protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10(5):555-8.
62. Bounous G, Papenburg R, Kongshavn PA, Gold P, Fleiszer D. Dietary whey protein inhibits the development of dimethylhydrazine induced malignancy. *Clin Invest Med.* 1988; 11(3):213-7.
63. Papenburg R, Bounous G, Fleiszer D, Gold P. Dietary milk proteins inhibit the development of dimethylhydrazine-induced malignancy. *Tumour Biol.* 1990; 11(3):129-36.
64. Attaallah W, Yilmaz AM, Erdogan N, Yalcin AS, Aktan AO. Whey protein versus whey protein hydrolyzate for the protection of azoxymethane and dextran

- sodium sulfate induced colonic tumors in rats. *Pathol Oncol Res.* 2012; 18(4):817-22.
65. Bensadoun A, Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem.* 1976; 70(1):241-50.
66. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75.
67. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5.
68. Dorrestein E, Ferreira RB, Laureano O, Teixeira AR. Electrophoretic and FPLC Analysis of Soluble Proteins in Four Portuguese Wines. *American Journal of Enology and Viticulture.* 1995; 46(2):235-42.
69. Vandooren J, Geurts N, Martens E, Van den Steen PE, Jonghe SD, Herdewijn P, et al. Gelatin degradation assay reveals MMP-9 inhibitors and function of O-glycosylated domain. *World J Biol Chem.* 2011; 2(1):14-24.
70. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987; 47(4):936-42.
71. Hernández-Ledesma B, del Mar Contreras M, Recio I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011; 165(1):23-35.
72. Pescuma M, Hebert EM, Mozzi F, Font de Valdez G. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content. *Food microbiology.* 2008; 25(3):442-51.

73. Mauriello G, Moio L, Moschetti G, Piombino P, Addeo F, Coppola S. Characterization of lactic acid bacteria strains on the basis of neutral volatile compounds produced in whey. *J Appl Microbiol.* 2001; 90(6):928-42.
74. Fitzgerald RJ, Murray BA. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology.* 2006; 59(2):118-25.
75. Brew K. α -Lactalbumin. In: Fox PF, McSweeney PLH, editores. *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins.* Springer US; 2003. p. 387-419.
76. Sawyer L. β -Lactoglobulin. In: Fox PF, McSweeney PLH, editores. *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins.* Springer US; 2003. p. 319-86.
77. Pescuma M, Hebert EM, Bru E, Font de Valdez G, Mozzi F. Diversity in growth and protein degradation by dairy relevant lactic acid bacteria species in reconstituted whey. *J Dairy Res.* 2012; 79(2):201-8.
78. Maurmayr A, Cecchinato A, Grigoletto L, Bittante G. Detection and Quantification of α S1-, α S2-, β -, κ -casein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin and Lactoferrin in Bovine Milk by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Agriculturae Conspectus Scientificus.* 2013; 78(3):201-05.
79. Varelias A, Cowin AJ, Adams D, Harries RH, Cooter RD, Belford DA, et al. Mitogenic bovine whey extract modulates matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 levels in chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 2006; 14(1):28-37.
80. Kessenbrock K, Wang CY, Werb Z. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. *Matrix Biol.* 2015
81. Levi E, Fridman R, Miao HQ, Ma YS, Yayon A, Vlodavsky I. Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(14):7069-74.

82. Li WW, Yu JY, Xu HL, Bao JK. Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 414(2):282-6.
83. Yoo YC, Watanabe R, Koike Y, Mitobe M, Shimazaki K, Watanabe S, et al. Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 237(3):624-8.
84. Eliassen LT, Berge G, Sveinbjornsson B, Svendsen JS, Vorland LH, Rekdal O. Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin. *Anticancer Res*. 2002; 22(5):2703-10.
85. Mader JS, Salsman J, Conrad DM, Hoskin DW. Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther*. 2005; 4(4):612-24.
86. Eliassen LT, Berge G, Leknessund A, Wikman M, Lindin I, Lokke C, et al. The antimicrobial peptide, lactoferricin B, is cytotoxic to neuroblastoma cells in vitro and inhibits xenograft growth in vivo. *Int J Cancer*. 2006; 119(3):493-500.
87. Kimura Y, Sumiyoshi M, Kobayashi T. Whey peptides prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin aging in melanin-possessing male hairless mice. *J Nutr*. 2014; 144(1):27-32.
88. Matsui T, Tamaya K, Seki E, Osajima K, Matsumoto K, Kawasaki T. Val-Tyr as a natural antihypertensive dipeptide can be absorbed into the human circulatory blood system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002; 29(3):204-8.
89. Matsui T, Imamura M, Oka H, Osajima K, Kimoto K, Kawasaki T, et al. Tissue distribution of antihypertensive dipeptide, Val-Tyr, after its single oral

administration to spontaneously hypertensive rats. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*. 2004; 10(9):535-45.

90. Masuda O, Nakamura Y, Takano T. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*. 1996; 126(12):3063-8.

91. Satake M, Enjoh M, Nakamura Y, Takano T, Kawamura Y, Arai S, et al. Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002; 66(2):378-84.

92. de Mejia EG, Dia VP. The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. *Cancer Metastasis Rev*. 2010; 29(3):511-28.

93. Dorman G, Cseh S, Hajdu I, Barna L, Konya D, Kupai K, et al. Matrix metalloproteinase inhibitors: a critical appraisal of design principles and proposed therapeutic utility. *Drugs*. 2010; 70(8):949-64.

94. Zucker S, Cao J, Chen WT. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene*. 2000; 19(56):6642-50.

95. Kruger A, Kates RE, Edwards DR. Avoiding spam in the proteolytic internet: future strategies for anti-metastatic MMP inhibition. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803(1):95-102.